

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DENISE NAOMI XAVIER SALMON

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOPROCESSO PARA A
PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E RECUPERAÇÃO DA
FITASE DE *Schizophyllum commune* OBTIDA POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

CURITIBA

2011

DENISE NAOMI XAVIER SALMON

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOPROCESSO PARA A
PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E RECUPERAÇÃO DA
FITASE DE *Schizophyllum commune* OBTIDA POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Processos Biotecnológicos ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Área de Concentração em Agroindústria e Biocombustíveis, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

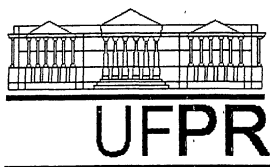
Orientadora: Profa. Dra. Michele Rigon Spier

Co-orientadores: Prof. Dr. Carlos Ricardo Socol

Profa. Dra. Luciana P.S. Vandenberghe

CURITIBA

2011



RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Universidade Federal do Paraná
Setor de Tecnologia
Curso de Doutorado em Processos
Biotecnológicos

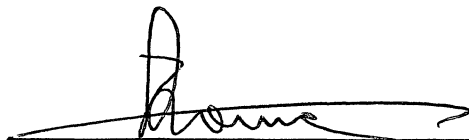
Aos vinte e nove dias do mês de abril de 2011, na Sala da Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Usinas Piloto B, primeiro andar, Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pela Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, a banca examinadora para a Quinquagésima Terceira Defesa de Dissertação de Mestrado, área de concentração: Agroindústria. Estiveram presentes no Ato, além da Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, ficou constituída pelos membros Profª Drª Vanete Thomaz Soccol (UP), Prof Dr Carlos Ricardo Soccol (UFPR), Profª Drª Débora Brand (UFPR), Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe (UFPR) e Profª Drª Michele Rigon Spier (UFPR - orientadora da dissertação).

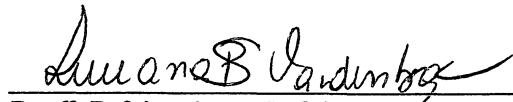
Às 9h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Denise Naomi Xavier Salmon** a fazer a apresentação da Dissertação intitulada: **“Desenvolvimento de um Bioprocesso para Produção, Caracterização e Recuperação da Fitase de *Schizophyllum commune* Obtida por Fermentação no Estado Sólido”**. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca composta pelos membros Profª Drª Vanete Thomaz Soccol, Prof Dr Carlos Ricardo Soccol, Profª Drª Débora Brand, Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe e Profª Drª Michele Rigon Spier declarou a candidata aprovada (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da Resolução 65/09 de 30.10.09).

Curitiba, 29 de Abril de 2011.


Profª Drª Vanete Thomaz Soccol


Prof Dr Carlos Ricardo Soccol


Profª Drª Luciana P S Vandenberghe


Profª Drª Débora Brand


Profª Drª Michele Rigon Spier

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Michele Rigon Spier por toda a sua dedicação e excelente orientação. Muito obrigada.

Ao professor Dr. Carlos Ricardo Soccol, pela oportunidade de realizar o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos da UFPR.

À Professora Dra. Luciana Porto de Souza Vandenberghe, sempre disposta a ajudar e solucionar problemas.

Às professoras Dra. Ana Lúcia Porto e Dra. Tatiana Souza Porto da UFRPE.

Ao professor Luciano Huergo do departamento de Bioquímica da UFPR.

Aos meus queridos estagiários ou os meus “anjinhos” como eu sempre dizia Francisco V. S. Silva, Fábio Santana, Renato Leal Binati, Luíza Cesca Piva, Priscila Zanette de Souza e Larissa Staack. Toda a dedicação, companheirismo e amizade durante esses dois anos de pesquisa.

À Mitiyo, que se tornou uma grande amiga, pela ajuda e auxílio no desenvolvimento da minha dissertação.

Aos meus queridos amigos que conquistei no laboratório e que sempre estavam dispostos a me ajudar: Alfredo Walter, Carlos Sanshuki, Sidnei Bordignon, Felipe Brisk, Carol Perottoni, Siliane Berté, Giovana Boff, Gisele Matos, Jeferson Costa, Mário Bier, Gerson OF, Júlio Frison, Francisco Vítola, Carol Tiemi, Vanessa Ghiggi, Pamela Harada, Fernanda Vasconcelos, Juliana Oliveira, Cristine Rodrigues.

Aos meus queridos e maravilhosos pais Odenis e Clara.

Ao suporte financeiro concedido pelo Programa CAPES/PROF durante os 2 anos de estudo e pesquisa.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivo Geral	4
1.2 Objetivos específicos.....	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Fitase.....	5
2.3 Fontes de fitases	8
2.4 Produção de fitases.....	8
2.5 Fósforo	12
2.6 Aplicações das fitases	13
2.6.1 Aplicação de fitases na alimentação animal	13
2.7 Impacto ambiental	16
2.8 Fermentação em estado sólido	17
2.8.1 Fatores que influenciam a FES.....	19
2.9 Farelo de trigo	21
2.10 Macromicetos	23
2.11 Basidiomicetos	25
2.12 <i>Schizophyllum commune</i>	26
2.13 Recuperação da fitase.....	27
2.13.1 Cromatografia de troca iônica.....	27
2.14 Extração Líquido-líquido.....	28
2.15 Eletroforese SDS – PAGE.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Seleção de linhagens produtoras de fitases	31
3.2 Critérios para a seleção de linhagens produtoras de fitases	31
3.3 Manutenção das linhagens.....	31
3.4 Identificação morfológica.....	32

3.5 Seleção de substratos/suporte para a fermentação em estado sólido	33
3.6 1º Pré-tratamento do substrato selecionado	33
3.7 2º Pré Tratamento do substrato selecionado	33
3.8 Caracterização físico química do substrato/suporte selecionado para a produção de fitase	34
3.9 Determinação da capacidade de absorção máxima de água do substrato	34
3.10 Preparo do Inóculo	35
3.11 Produção da enzima por fermentação em estado sólido.....	35
3.12 Otimização do bioprocesso para a produção de fitase.....	35
3.13 Extração sólido-líquido da enzima fitase	36
3.14 Atividade enzimática.....	37
3.15 Determinação de proteínas (atividade específica).....	38
3.16 Determinação do teor de umidade	38
3.17 Caracterização do extrato bruto contendo fitase produzida por <i>S.</i> <i>commune</i>	38
3.17.1 Efeito do pH na atividade da fitase	38
3.17.2 Efeito do pH na estabilidade da fitase a 4°C	38
3.17.3 Efeito da temperatura na atividade da fitase.....	39
3.17.4 Inativação térmica da fitase e determinação da constante k e meia vida da enzima.....	39
3.17.5 Influência dos íons metálicos na atividade da fitase	40
3.17.6 Efeito da concentração de fosfato inorgânico na atividade da fitase .	40
3.17.7 Determinação da especificidade da enzima produzida ao substrato ácido fítico.....	Erro! Indicador não definido.
3.17.8 Determinação das constantes de Michaelis-Menten (K_m) e da velocidade máxima ($V_{máx}$)	40
3.17.9 Efeito da concentração de NaCl	41
3.17.10 Estudo da estabilidade da fitase em diferentes condições de armazenamento	41

3.17.11 Estudo do incremento da estabilidade da fitase com adição de aditivos no extrato bruto.....	41
3.18 Cinética de produção de fitase em FES	42
3.18.1 Determinação de açúcares totais.....	43
3.18.2 Determinação da biomassa microbiana	43
3.19 Recuperação da fitase.....	44
3.19.1 Extração líquido-líquido	44
3.19.2 Clarificação do Extrato Bruto	46
3.19.3 Ultrafiltração.....	47
3.19.4 Diálise	47
3.19.5 Cromatografia de troca iônica	47
3.19.6 Liofilização	48
3.19.7 Eletroforese SDS-PAGE	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Seleção de linhagens produtoras de fitases	50
4.2 Identificação morfológica.....	50
4.3 Seleção de substratos/suporte para a fermentação em estado sólido	51
4.4 1º Pré-tratamento do substrato selecionado	53
4.5 2º Pré-Tratamento do substrato selecionado	54
4.6 Caracterização físico-química do substrato/suporte selecionado para produção de fitase.....	55
4.7 Otimização do bioprocessos para a produção de fitase.....	56
4.8 Caracterização da fitase de <i>S. commune</i>	62
4.8.1 Efeito do pH na atividade da fitase	62
4.8.2 Efeito do pH na estabilidade da fitase a 4°C.....	63
4.8.3 Efeito da temperatura na atividade da fitase.....	64
4.8.4 Inativação térmica da fitase, determinação da constante k e meia vida da enzima	65

4.8.5 Influência dos íons metálicos na atividade da fitase	66
4.8.6 Influência da concentração de fosfato inorgânico na atividade da fitase	67
4.8.7 Determinação da especificidade ao substrato, determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima ($V_{máx}$) da reação enzimática.....	69
4.8.8 Efeito da concentração de NaCl	70
4.8.9 Estudo da estabilidade da fitase com adição de estabilizantes no extrato bruto.....	73
4.9 Cinética de produção de fitase por <i>S. commune</i>	76
4.10 Recuperação da fitase.....	77
4.10.1 Extração líquido-líquido da fitase.....	77
4.10.2 Cromatografia de troca iônica.....	83
4.10.3 Ultrafiltração.....	85
4.10.4 Eletroforese SDS-PAGE	86
5. CONCLUSÕES	88
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	90
REFERÊNCIAS	91

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Reação de hidrólise da fitase.....	5
FIGURA 2. Estrutura do fitato (sal de ácido fítico). Representação do complexo formado com proteína, aminoácido e o cálcio.....	7
FIGURA 3. Farelo de trigo.....	22
FIGURA 4. Macromiceto <i>Schizophyllum commune</i>	26
FIGURA 5. Aparato para a corrida eletroforética de proteínas.....	30
FIGURA 6. Fluxograma do processo de fermentação em estado sólido....	37
FIGURA 7. Fluxograma das etapas de recuperação da fitase.....	49
FIGURA 8. Imagem do cultivo de <i>S. commune</i> para indução do corpo de frutificação utilizado para a identificação macroscópica.....	51
FIGURA 9. Estudo da influência do 1º pré tratamento no farelo de trigo na produção de fitase por <i>S. commune</i> em 72 horas de FES.....	54
FIGURA 10. Estudo da influência do 2º pré tratamento do farelo de trigo na produção de fitase por <i>S. commune</i> em 72 horas de FES.....	55
FIGURA 11. A - Superfície de contorno apresentando a região ótima de produção de fitase com as variáveis independentes significativas: concentração de sacarose e temperatura de fermentação; B – Superfície de contorno apresentando a região ótima de produção de fitase e os valores de taxa de inóculo e temperatura de fermentação; C - Superfície de contorno apresentando a influência da concentração de sacarose 5% e a taxa de inóculo 7,5 % na produção de fitase.....	58
FIGURA 12. Gráfico de Pareto apresentando as variáveis e as interações significativas da otimização da produção de fitase por <i>S. commune</i> . Onde (1) temperatura de fermentação °C; (2) concentração de sacarose %; (3) concentração de extrato de levedura % (4) pH; (5) taxa de inóculo %.....	61
FIGURA 13. Efeito de diferentes valores de pH durante a reação enzimática para a determinação do pH ótimo da enzima.....	63
FIGURA 14. Efeito de diferentes valores de pH na estabilidade da fitase durante 24, 48, 72 e 96 horas de armazenamento a 4°C.	64
FIGURA 15. Efeito de diferentes temperaturas na atividade da fitase durante a reação enzimática.	65
FIGURA 16. Inativação térmica da fitase à 50°C.....	66

FIGURA 17. Influência da concentração de fosfato inorgânico na atividade de fitase.....	68
FIGURA 18. Efeito da concentração de fitato de sódio na atividade da fitase.....	69
FIGURA 19. Gráfico de Linearização por Lineweaver Burk para a determinação das constantes K_m e V_{max}	70
FIGURA 20. Efeito da concentração de NaCl na estabilidade da fitase.....	71
FIGURA 21. Estudo da estabilidade da fitase à temperatura ambiente, refrigeração e congelamento durante 140 dias.....	72
FIGURA 22. Influência da adição de aditivos (concentração máxima) na atividade da fitase em 130 dias de armazenamento em temperatura ambiente.....	74
FIGURA 23. Influência da adição de aditivos (concentração de média) na atividade da fitase em 98 dias de armazenamento em temperatura ambiente.....	75
FIGURA 24. Influência da adição de aditivos (concentração mínima) na atividade da fitase em 90 dias de armazenamento em temperatura ambiente.....	75
FIGURA 25. Cinética de produção de fitase apresentando a evolução dos parâmetros (açúcares totais, biomassa, pH e atividade de fitase) por <i>S. commune</i> utilizando farelo de trigo pré-tratado.....	77
Figura 26. Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta o coeficiente de partição (K) da fitase. Os significados dos símbolos são: (1) concentração de Citrato; (2) Massa molar do PEG; (3) Concentração do PEG; (4) pH.....	79
FIGURA 27. Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta da recuperação da fitase (Y). Os significados dos símbolos são: (1) concentração de Citrato; (2) Massa molar do PEG; (3) Concentração do PEG; (4) pH.....	80
FIGURA 28. Diagrama de interpretação geométrica dos efeitos, tendo como variável resposta a recuperação (Y) da fitase para analisar o pH em função concentração de PEG durante a SDFA.....	81
FIGURA 29. Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta o fator de purificação da fitase (AP). Os significados dos símbolos são: (1) concentração de Citrato; (2) Massa molar do PEG; (3) Concentração do PEG; (4) pH.....	82
FIGURA 30. Sistema de duas fases aquosas PEG/Citrato para extração da fitase de <i>S. commune</i> em tubos graduados.....	83

FIGURA 31. Perfil cromatográfico de eluição da fitase de <i>S. commune</i> em resina aniônica DEAE-Sepharose.....	84
FIGURA 32. Cromatografia de troca catiônica em resina SP-sepharose com eluição da fitase de <i>S. commune</i>	85
FIGURA 33. Etapa de ultrafiltração do extrato bruto da FES de <i>S. commune</i>	86
FIGURA 34. Eletroforese SDS-PAGE da fitase produzida por <i>S. commune</i> . O poço nomeado MM corresponde aos marcadores moleculares (Fermentas) utilizados: 116,0; 66,2; 45,0; 35,0; 25,0; 18,4; e 14,4 kDa.....	87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Porcentagem de ácido fítico presente em sementes, grãos, legumes e frutas.....	6
TABELA 2. Produção de fitase por diversos micro-organismos por FES.....	11
TABELA 3. Exemplos de fitases comerciais disponíveis no mercado mundial.....	13
TABELA 4. Aplicações da FES e seus produtos.....	18
TABELA 5. Vantagens e Desvantagens da FES.....	19
TABELA 6. Composição do farelo de trigo.....	23
TABELA 7. Níveis das variáveis independentes e seus níveis decodificados.....	36
TABELA 8. Aditivos e suas respectivas concentrações no extrato bruto enzimático.....	42
TABELA 9. Variáveis e níveis do planejamento fatorial completo 2^4 do SDFA da extração da fitase de <i>S. commune</i>	45
TABELA 10. Linhagens de microrganismos selecionados para a produção de fitases.....	50
TABELA 11. Gráfico da seleção de substratos em FES 72, 96 e 120 horas, para produção de fitase por <i>S. commune</i>	52
TABELA 12. Composição centesimal do farelo de trigo cru e o farelo de trigo pré-tratado.....	56
TABELA 13. Resultados da produção de fitase (U/gbs) com 37 experimentos utilizando o planejamento completo 2^5 para análise estatística.....	57
TABELA 14. Efeito estimado durante a otimização.....	62
TABELA 15. Influência dos íons metálicos na atividade da fitase.....	67
TABELA 16. Influência dos estabilizantes em concentrações máxima, média e mínima na atividade da fitase.....	74
TABELA 17. Resultados do planejamento fatorial completo (2^4) da extração da fitase na fase superior (PEG) do sistema PEG/Citrato.....	78
TABELA 18. Resultados da recuperação da fitase por <i>S. commune</i>	84

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

ANOVA	- Análise de variância
AP	- Aumento de pureza
Atm	- Atmosfera
β	- Beta
DEAE	- Dietilaminoetil
D.O.	- Densidade óptica
EC	- Enzyme Comission
FES	- Fermentação no estado sólido
FSm	- Fermentação submersa
g	- Grama
HPLC	- <i>High Performace Liquid Chromatography</i>
K	- Coeficiente de partição
KDa	- Kilodalton
Km	- Constante de Michaelis Menten
L	- Litros
M	- Molar
min	- Minutos
mL	- Mililitros
m/m	- Massa / massa
mmol	- Milimol
NRRL	- Northern Regional Research Laboratory
P	- Fósforo
PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida
PDA	- <i>Potato dextrose ágar</i>
PEG	- Polietilenoglicol

p/v	- Peso / volume
SDFA	- Sistemas de duas fases aquosas
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
STAT	- Statistica Software
SP	- Sulfopropil
TNT	Tecido de polipropileno
Tris	- Tris (hidroximetil aminometano)
U / gbs	- Unidade de atividade enzimática por grama na base seca
UV	- Ultravioleta
V _{máx}	- Velocidade máxima
v/v	- Volume/volume
Y	- Rendimento
μm	- Micrômetro
μmol	- Micromol

RESUMO

As fitases hidrolisam o ácido fítico em inositol e fosfatos, os quais se encontram armazenados em grãos, sementes e legumes. Fitases podem ser produzidas por processos de fermentação submersa (FSm) ou fermentação no estado sólido (FES). A FES é a mais vantajosa, pois pode utilizar resíduos agroindustriais como substrato/suporte, os quais apresentam baixo custo e possuem elevado rendimento de produção final. As fitases apresentam aplicações em ração animal e produtos para consumo humano. Estas melhoram a absorção do fósforo, de outros nutrientes no organismo e também reduzem a quantidade de fósforo eliminado nos excrementos dos animais resultando em benefícios para o meio ambiente. O presente trabalho teve como objetivo otimizar a produção da enzima fitase de *S. commune* por FES utilizando o farelo de trigo como substrato/suporte, caracterizar, recuperar a fitase produzida, estudar a extração líquido-líquido da fitase além de estudar a sua estabilidade durante o armazenamento. O basidiomiceto *Schizophyllum commune* foi selecionado como um produtor de enzima fitase utilizando o farelo de trigo como substrato/suporte para a produção de fitase. Para a otimização da produção de fitase foi realizado um planejamento experimental fatorial fracionado Box-Behnken design 3⁵ utilizando cinco variáveis independentes (temperatura, concentração de sacarose, concentração de extrato de levedura, pH e taxa de inóculo) em três níveis (+1, 0, -1) e cinco pontos centrais totalizando 37 experimentos. A produção máxima de fitase (113,76 U/gbs) foi obtida com o meio suplementado com sacarose 5%, pH 7, taxa de inóculo 7,5% e temperatura de fermentação de 33°C. Esse resultado aumentou 285% a produção de fitase em 72 horas de fermentação. A fitase apresentou uma atividade ótima em pH 5 e temperatura de 50°C, K_m e $V_{máx}$ de 0,16 mM e 1,85 $\mu\text{mol/mL.min}$ respectivamente. A fitase foi ativada na presença de K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Na^+ acetato e citrato e completamente inibida por molibdato de amônio. A melhor condição de armazenamento para a manutenção da estabilidade da enzima sob refrigeração (4°C) com 22% de atividade relativa em 125 dias. Estudos preliminares com estabilizantes no extrato bruto enzimático foram realizados apontando o aditivo A (0,25% p/v) como o melhor agente estabilizante o qual mantém 109% de atividade relativa durante 90 dias de armazenamento à temperatura ambiente de 25°C. A extração líquido-líquido da enzima utilizando as condições de concentração de citrato 14% (m/m), massa molar de PEG 1500, concentração do PEG 22% (m/m) e pH 7 também apresentou um resultado satisfatório, com recuperação de 367 %, fator de purificação de 5,43 e coeficiente de partição de 2,63.

ABSTRACT

Phytases hydrolyze phytic acid to inositol and phosphates, which are stored in grains, seeds and vegetables. Phytases can be produced by submerged fermentation (SmF) and solid-state fermentation which is most used and commercially advantageous. It can use agroindustrial residues as substrate/support, which reduces the cost of the bioprocess and the final price of the enzyme. Phytases have applications in feed and products for human consumption. Phytases improve phosphorus absorption and others nutrients and also reduce the amount of phosphorus eliminated in the animals excrements resulting in benefits to the environment. This study aimed to optimize the phytase production of *S. commune* by SSF, characterize, recovery the produced phytase, study the liquid-liquid extraction and the stability during storage. The basidiomycete *Schizophyllum commune* was selected as a major of phytase producer using wheat bran as substrate/support for the phytase production. The optimization of phytase production was carried out by a full 3^5 fractional factorial Box-Behnken experimental designs using five independent variables (temperature, sucrose concentration, yeast extract concentration, pH and inoculum rate) at two levels (+1, 0, -1) and five central points totalizing 37 experiments. The maximal level of phytase (113.76 U/gds) was obtained in a medium containing sucrose 5%, pH 7.0, inoculum rate 7.5% at 33°C during 72 hours. This result increased 285% the phytase production in 72 hours fermentation. The enzyme had an optimum pH 5 and 50°C, K_m and V_{max} of 0.16 mM and 1.85 mmol / mL min, respectively. The enzyme was activated in the presence of K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Na^+ , acetate and citrate and completely inhibited by ammonium molybdate. The best storage condition for maintaining the enzyme stability was at 4 ° C, with 22% relative activity in 125 days. Preliminary studies with stabilizers agents in crude enzymatic extract were performed, resulting in additive A (0.25% w/v) as the best stabilizing agent with 109% relative activity during 90 days of storage at room temperature 25°C. The liquid liquid extraction of ezyme using citrate 14% (m/m), PEG 1500, PEG concentration of 22% (w/w) and pH 7 also had satisfactory results, with a partition coefficient of 2.63, yield 367% and purification factor of 5.43.

1. INTRODUÇÃO

Processos biotecnológicos têm oferecido grandes possibilidades de inovações, como o desenvolvimento e melhoria de alimentos para humanos e animais, a produção e a utilização de novas enzimas, desenvolvimento de insumos e produtos farmacêuticos, dentre outras subáreas relacionadas.

Pesquisas sobre a obtenção de enzimas por processos biotecnológicos têm sido intensivos, cujas possibilidades de uso apresentarão acentuado crescimento nas próximas décadas. A necessidade de maximização dos processos biológicos industriais, paralelamente à importância que elas apresentam quando consideradas as suas diversas aplicações, nas indústrias de alimentos e de ração animal, papel e celulose, têxtil, química, farmacêutica, entre outras.

O mercado mundial de enzimas apresentou crescimento de 7,6 % de produção ao ano e em torno de 6 bilhões de dólares em 2010 (GLOBAL DEMANDS FOR ENZYMES, 2011). PANDEY et al (2001a) mencionaram que o uso de enzimas alimentares representa um mercado mundial em expansão, cujos valores giram em torno do US\$ 5 bilhões por ano. Os mesmos autores relataram que dos produtos industriais usados na alimentação animal 6% contêm enzimas, ao passo que 80% contêm vitaminas. A produção e a purificação das enzimas envolvem inúmeras variáveis que devem ser mantidas sob controle, com custos relativamente altos. Contudo, existem alternativas industriais para a obtenção, separação e recuperação de enzimas, com relação custo-benefício mais favorável.

Enzimas utilizadas na alimentação de animais monogástricos têm se destacado atualmente, e as fitases são um grupo de enzimas utilizadas na composição da ração de aves, suínos, ruminantes e peixes. Pesquisas recentes observam o desenvolvimento e estudos de aplicação de fitases no processamento de produtos para consumo humano (GREINER e KONIETZNY 2006; AFINAH et al., 2010). A fitase ou mio-inositol-hexaquifosfato fosfohidrolase, é uma fosfatase fitato-específica que catalisa a hidrólise do ácido fítico, ou mio-inositol hexafosfato, formando inositol e liberando fosfato

inorgânico. O ácido fítico, uma fonte orgânica de fósforo predominante nos grãos de cereais, legumes e sementes oleaginosas são considerados de valor significativo no acréscimo da qualidade nutricional de alimentos ricos em ácido fítico. O problema relacionado ao consumo destes alimentos na dieta é a presença do fator antinutricional, o fitato, pois reduz a absorção de nutrientes e minerais importantes. A adição da enzima em rações animais pode aumentar a disponibilidade de aminoácidos, proteínas e íons divalentes. Em benefício ambiental, contribuem para a diminuição nos níveis de fósforo excretado pelo animal, propiciando assim benefícios econômicos e ambientais (PANDEY, 2001b).

Segundo Waldroup (1999), existem diversas razões para a difusão e aplicação do uso de enzimas na nutrição animal e dentre as mais citadas estão a melhora do desempenho zootécnico dos animais, a redução na variação da qualidade dos ingredientes inseridos numa dieta e a redução na contaminação ambiental pela perda de nutrientes ao meio ambiente.

A fermentação no estado sólido é cada vez mais considerada como uma alternativa da fermentação submersa para a produção de enzimas com aplicações industriais e agro biotecnológicas, pois apresentam maior economia no processo quando comparada ao processo de fermentação submersa (SPIER et al., 2005). A aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos utiliza substratos alternativos e também auxilia na resolução de problemas de poluição ambiental (SINGHANIA et al., 2007).

O desenvolvimento do cultivo de cogumelos apresenta uma grande importância na indústria biotecnológica em todo o mundo (ROSE, 2005). O Brasil tem uma das maiores áreas de cultivo do mundo, produzindo uma diversidade de resíduos agrícolas que são subutilizados e que poderiam ser aproveitados como substrato para o cultivo de cogumelos capazes de produzir biomassa, frutificar e produzir compostos de interesse comercial (EIRA e MINHONI, 1997). Esses compostos compreendem em uma grande diversidade de substâncias bioativas em alimentos, ração animal, fertilizantes, medicamentos entre outros, além de contribuir para o meio ambiente. A

utilização de cogumelos na ciência ainda é recente e os investimentos em pesquisas são limitadas, porém ainda tem muito a ser explorado devido à biodiversidade de cogumelos no Brasil (PANDEY, 2007).

1.1 Objetivo Geral

O principal objetivo do presente trabalho é a produção, caracterização, recuperação e o estudo da estabilidade da enzima fitase produzida a partir de microrganismos em fermentação no estado sólido utilizando resíduos agroindustriais como substrato.

1.2 Objetivos específicos

- Selecionar microrganismos produtores de fitase provenientes do Banco de culturas do laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR;
- Selecionar um resíduo agroindustrial que apresente potencial como substrato/suporte na fermentação no estado sólido para a produção de fitase;
- Otimizar as condições físico-químicas do processo fermentativo para a produção da enzima fitase;
- Caracterizar a fitase produzida no extrato bruto através dos estudos de: efeito do pH na estabilidade da enzima, da concentração de substrato, obtenção das constantes K_m e $V_{máx}$, temperatura ótima, pH ótimo, íons ativadores e inibidores, inativação térmica, determinação da constante K e meia vida da enzima, estabilidade durante o armazenamento.
- Estudar a influência de alguns aditivos na estabilidade da enzima produzida à temperatura ambiente;
- Realizar a extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas;
- Recuperar a fitase produzida.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fitase

A fitase ou mio-inositol hexaquifosfato fosfohidrolase é uma enzima pertencente ao grupo das fosfatases de histidina ácida que hidrolisa o ácido fítico em mio-inositol e ácido ortofosfórico, necessário ao processo metabólico de biossíntese celular (PANDEY et al., 2001b; ANDRIOTIS et al., 2003). Há duas classes de fitase que são reconhecidas pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* e a *International Union of Biochemistry*: mio-inositol hexaquifosfato 3-fosfohidrolase, denominada 3-fitase, de origem microbiana, e mio-inositol hexaquifosfato 6-fosfohidrolase, denominada 6-fitase ou fitato 6-fosfatase, derivada das plantas (VOHRA e SATYANARAYANA, 2003; QUAN et al., 2004). A 3-fitase (EC 3.1.3.8) remove o fosfato da posição D-3 do anel do mio-inositol do ácido fítico e a 6-fitase (EC 3.1.3.26) desfosforila o fitato na posição L-6 (D-4) (FIGURA 1).

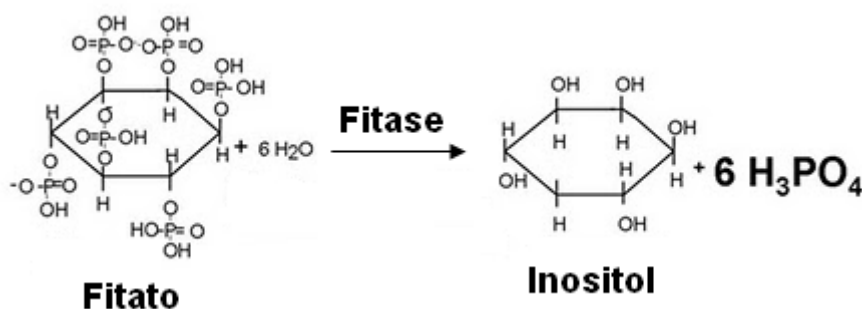


FIGURA 1. Reação de hidrólise do fitato (sal de ácido fítico) pela fitase

Fonte: Enviropig™, 2011 modificado.

2. 2 Ácido fítico

O ácido fítico ($C_6H_{18}O_{24}P_6$) ou mio-inositol-1,2,3,4,5,6-hexafosfato (FIGURA 2), é um anel com 6 carbonos com 6 grupamentos fosfatos ligados aos carbonos com peso molecular de 659.86 (VOHRA e SATYANARAYANA, 2003). Ácido fítico é um componente das plantas, sementes e cereais que

possui 60-90% total de fósforo armazenado (TABELA 1) (ZUO et al., 2010). Os complexos insolúveis são formados pela interação de ácido fítico, um poderoso agente quelante, com certos íons divalentes, como Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , e proteínas (QUAN et al., 2004). O ácido fítico é um anti-nutriente que provoca uma diminuição da biodisponibilidade de alguns elementos minerais, proteínas, aminoácidos e também interfere na atividade de algumas enzimas digestivas, formam complexos através de ligações iônicas, causando problemas nutricionais, má absorção dos minerais no trato gastro intestinal em humanos e animais (FIGURA 2) (IN et al., 2009; NOUREDDINI e DANG, 2008). Os minerais estão envolvidos na ativação intracelular e extracelular de enzimas, na regulação dos níveis de pH dos fluidos corporais que são necessários para o controle de reações metabólicas, e o equilíbrio osmótico entre a célula e seu ambiente. A deficiência de qualquer um dos minerais essenciais pode resultar em graves distúrbios metabólicos e comprometer a saúde do organismo.

TABELA 1. Porcentagem de ácido fítico presente em sementes, grãos, legumes e frutas

Sementes/Grãos/Legumes//Frutas	% ácido fítico (p/p)
Gergelim	4,71
Abóbora	4,08
Canola	2,50
Tomate	1,66
Soja	1,55
Feijão	1,41
Cevada	1,02
Trigo	1,02
Aveia	1,02

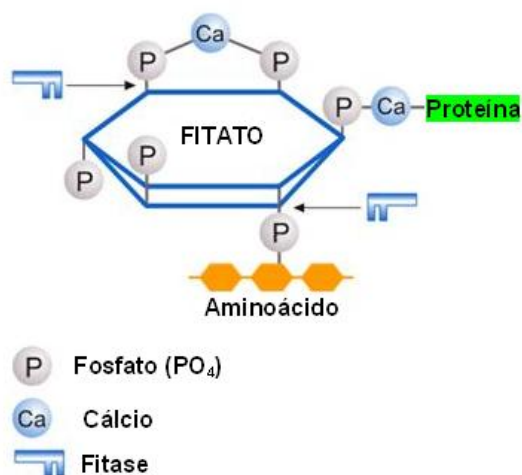


FIGURA 2. Estrutura do fitato (sal de ácido fítico). Representação do complexo formado com proteína, aminoácido e o cálcio. (Fonte: Excel Animal Health, 2011.)

A taxa de utilização de fósforo em rações de animais monogástricos varia entre 0 e 40%. O fósforo também pode causar poluição ambiental, pois este é pouco absorvido pelos animais monogástricos saturando solos e lençóis freáticos e causando a eutrofização das águas. Este fenômeno ocorre quando certos nutrientes são adicionados em rios e lagos, causando um rápido crescimento de plantas, especialmente as algas. Estas podem cobrir as superfícies de lagos e rios isolando a água do oxigênio do ar, ocorrendo a desoxigenação da água, aumentando a produção de dióxido de carbono liberados para atmosfera, diminuindo a penetração dos raios solares na água e, conseqüentemente, diminui a produção de oxigênio durante a fotossíntese, além de prejudicar vida dos animais aquáticos (FERREIRA et al., 2007).

A digestão e o aproveitamento do alimento podem ser aumentados pela adição de enzimas na alimentação, como, por exemplo, pela adição da fitase microbiana, que hidrolisa o fitato para mio-inositol e ácido ortofosfórico, necessário ao processo metabólico de biossíntese celular. Desta forma, parte do fósforo, antes não disponível, passa a ser aproveitado pelo organismo, tornando possível reduzir em até 30% o fósforo suplementado na alimentação (KUMAR et al., 2010).

Estudos sobre a produção e a utilização da enzima fitase para reduzir a suplementação de fósforo inorgânico nos alimentos e consequente redução na excreção de fósforo fecal têm intensificado pesquisas sobre fitases.

2. 3 Fontes de fitases

De acordo com Liu et al. (1998), a fitase é naturalmente encontrada em cereais como arroz, trigo, milho, soja, feijão e outras leguminosas ou sementes oleaginosas. A fitase também pode ser produzida por bactérias, leveduras, fungos e por alguns tecidos animais. Mesmo apresentando diferentes fontes de fitase, pesquisas têm comprovado que as mais promissoras comercialmente ainda são as microbianas, como as provenientes das bactérias *Bacillus* sp. (JOSEPH e RAJ, 2007), *Pseudomonas* sp. (HOSSEINKHANI et al., 2009), *Klebsiella* sp. (SAJIDAN et al., 2007), *Enterobacter* sp. (YOON et al., 1996), *Yersinia* sp. (FU et al., 2008), de leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* (IN et al., 2008), *Candida* sp. (QUAN, 2001), *Kodamea ohmeri* (LI et al., 2008), *Schwanniomyces occidentalis* (HAMADA et al., 2005) e fungos como *Aspergillus* sp. (SPIER et al., 2010), *Penicillium* sp. (ZHAO et al., 2010) e *Rhizopus oligsporus* (AZEKE et al., 2011). Estudos utilizando fitase a partir de cogumelos ainda são limitados, porém *Agaricus biosporus*, *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa* e *Pleurotus cornucopiae* foram reportados como produtores de fitase nos estudos de COLLOPY e ROYSE (2004), porém com produção pequena quando comparada aos já reportados na literatura.

Fitases podem estar presentes em algumas plantas como, milho, aveia, centeio e cevada (EECKHOUT e PAEPE, 1994). Fitase alcalina do pólen da flor de lírio *Lilium longiflorum* também foi reportada por GARCHOW et al., 2006. A atividade da fitase também foi estudada na mucosa intestinal de ratos, galinhas, bezerros e humanos (BITAR e REINHOLD, 1972).

2. 4 Produção de fitases

A enzima fitase pode ser produzida por dois processos fermentativos: fermentação líquida submersa (FSm) e fermentação em estado sólido (FES).

As condições de cultivo, concentração, natureza do substrato e a disponibilidade dos nutrientes são fatores que devem ser considerados na escolha da técnica a ser utilizada na sua produção, segundo Vats e Banejee, (2004). A fermentação submersa é o cultivo de um determinado micro-organismo em um meio líquido rico em nutrientes. Os micro-organismos utilizam estes nutrientes para produzir as enzimas e metabólitos. Micro-organismos extracelulares excretam as enzimas para o meio líquido de fermentação. A síntese de fitase efetuada pela membrana celular de micro-organismos é comercialmente a forma mais promissora de produção da enzima, e apesar da habilidade de produção das bactérias e leveduras, os fungos são mais utilizados pois apresentam maior estabilidade térmica (PANDEY et al. 2001a).

Parâmetros como temperatura, pH, consumo de oxigênio, formação de dióxido de carbono, o micro-organismo escolhido, a natureza do substrato e disponibilidade de nutrientes devem ser controlados e considerados durante todo o processo de fermentação. Apesar da fermentação submersa ser muito utilizada e estudada, possui algumas desvantagens, como o alto custo do processo. Singh e Satyanarayana (2008) estudaram a produção de fitase de *Sporotrichum thermophile* em fermentação submersa e otimizaram os parâmetros que afetam o processo. Com o auxílio de ferramentas estatísticas, este estudo teve a finalidade de aumentar a síntese da enzima, o seu rendimento, e diminuir custos do processo. O resultado foi de 3,73 vezes o aumento na produção de fitase, utilizando meio com 3% de farelo de trigo ao invés de fitato de sódio como substato.

Fitases também podem ser produzidas industrialmente por fermentação submersa utilizando a tecnologia do DNA recombinante com micro-organismos geneticamente modificados. Porém, o custo da produção em FSm é alto devido a recuperação da enzima, muitas vezes inviabilizando todo o processo. Estudos relatam clonagem e expressão dos genes de fitases fúngicas de *A. niger* (MULLANEY et al., 1991), *A. fumigatus* (PASAMONTES et al., 1997), *A. terreus* e *Myceliophthora thermophila* (MITCHELL et al., 1997), fitases de basidiomicetos *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, *Ceriporia* sp. e *Trametes*

pubescens (LASSEN et al., 2001) para aumentar a produção da enzima, bem como melhorar a termoestabilidade, especificidade, *shelf-life* e possuir atividade em uma ampla faixa de pH. A produção comercial das fitases se concentra principalmente no fungo do gênero *Aspergillus* sp. No entanto, novas fitases de variadas fontes têm sido estudadas para melhorar as características funcionais da enzima. A fitase comercial Natuphos (BASF) foi a primeira fitase recombinante expressa por *A. niger* NRRL 3135 com seu gene clonado em múltiplas cópias e produzidos por fermentação submersa (MULLANEY e ULLAH, 2000 ; VAN DIJCK, 1999). A Ronozyme (Novozymes) é também uma fitase recombinante proveniente de *Peniophora lycii*, um basidiomiceto de onde o gene da fitase foi clonado, expressado e produzido em *A. niger* por fermentação submersa (MULLANEY e ULLAH, 2000). Outras fitases comerciais, tais como Phyzyme XP (Danisco, Brabrand, Dinamarca) e OptiPhos (JBS United, Indiana, EUA) são genes recombinantes de fitase de *E. coli* expressos e produzidos em *Bacillus* sp.

A produção de fitases fúngicas se mostra mais vantajosa pela facilidade de extração da enzima do ponto de vista industrial, já que os fungos sintetizam enzimas extracelulares que são lançadas em um substrato externo e, portanto, elimina-se a etapa de rompimento celular de enzimas intracelulares. A fermentação em estado sólido (FES) é uma alternativa para a produção de enzimas, sob o ponto de vista econômico. Tengerdy (1996) estimou os custos de produção de enzimas celulasas por FES \$ 0,2 dólares/kg, e em contraste com \$ 20 dólares/kg por FSm.

Costa et al (2006) estudaram a produção de fitase de *Aspergillus ficuum* DSM 932 por FSm e FES. A maior produção foi alcançada por FES 56,43 U/ g utilizando resíduo de canola como substrato e 0,25 U/mL de fitase em FSm. Gulati et al (2007) produziram fitase proveniente de um fungo termotolerante *Mucor indicus* MTCC 6333. Parâmetros da FES foram otimizados (fontes de carbono e nitrogênio, temperatura de fermentação, pH, tempo de fermentação e taxa de inóculo) para obtenção de 513 U/ grama de substrato seco. A tabela 2 mostra algumas produções de fitase por FES reportadas na literatura recentemente.

A utilização de resíduos agroindustriais são geralmente considerados os melhores substratos para a produção de fitases por FES, o qual pode alcançar alta produtividade com menor custo de produção. Os resíduos também são utilizados como suportes durante a FES, podendo ser inertes ou serem fontes de energia e nutrientes (HÖLKER et al., 2004). Geralmente enzimas obtidas por FES possuem propriedades mais adequadas às aplicações industriais, como estabilidade às temperaturas mais elevadas e a faixas variáveis de pHs (DESCHAMPS E HUET, 1985; ACUNA ARGUELLES et al., 1995).

A maior produtividade enzimática é encontrada em FES, mas o fato de que este cultivo aproxima-se muito do ambiente natural de crescimento dos micro-organismos explica, em parte, as diferenças constatadas entre FES e FSm (JECU, 2000; PANDEY et al., 2003).

TABELA 2. Produção de fitases fúngicas por FES.

Micro-organismo	Substrato	Fitase (U/gbs)*	Referências
<i>Aspergillus niger</i> FS3	Polpa cítrica	93	Spier et al., 2011
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo	154	Bhavsar et al., 2010
<i>Pseudomonas</i> AP-MSU	Farinha de mandioca	73	Esakkiraj et al., 2010
<i>Aspergillus ficuum</i>	Resíduo de canola	56.43	Costa et al., 2009
<i>Malbranchea sulfurea</i>	Farelo de trigo	2.84	El-Gindy et al., 2009
<i>Aspergillus niveus</i>	Farelo de milho	3.4	El-Gindy et al, 2009
<i>Mucor racemosus</i>	Resíduo de gergelim, farelo de trigo	44.5	Roopesh et al., 2008
<i>Sporotrichum thermophile</i> TLR50	Resíduo de gergelim	180	Singh e Satyanarayana, 2008
<i>Aspergillus niger</i>	Resíduo de oliveira	58	Vassilev et al., 2007
<i>Aspergillus oryzae</i>	Soja e arroz	16	Chantasartrasamee et al., 2005
<i>Grifola frondosa</i>	Serragem suplementada com centeio e milho	0.287	Collopy e Royse, 2004
<i>Lentinus edodes</i>	Serragem suplementada com centeio e milho	0.107	Collopy e Royse, 2004
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Resíduo de coco	14.29	Sabu et al., 2002

* (U/gbs) = Unidades por grama em base seca.

2. 5 Fósforo

O fósforo é um componente importante dos ácidos nucleicos, na formação do DNA e do RNA. Nas membranas celulares, o fósforo é constituinte dos fosfolipídios que integram e dão flexibilidade às membranas celulares, e um dos principais constituintes dos componentes estruturais dos tecidos esqueléticos. Também está diretamente envolvido na produção de energia em reações celulares. As células utilizam-no para armazenar e transportar a energia na forma de adenosina-trifosfato (ATP). Assim, é um nutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento esquelético. Desempenha papel de co-fator de múltiplos sistemas enzimáticos no metabolismo de gorduras, carboidratos, lipídios e proteínas. Regula o equilíbrio ácido-básico do plasma, mantém a integridade do sistema nervoso central e dos rins. Importante para a mineralização da estrutura óssea, síntese de colágeno e homeostase do cálcio, regulador da excreção renal e também auxilia o organismo na utilização de vitaminas. Tanto o excesso, quanto a deficiência interferem na absorção de cálcio e no metabolismo (MCDOWELL, 2003).

A deficiência de fósforo também pode ser observada em algumas patologias relacionadas ao envelhecimento como a artrite reumatóide, a artrose, a osteoporose e também em casos de litíase renal, devido as desordens orgânicas (ANDERSON, 1996).

O fósforo é um fertilizante indispensável para a agricultura, e também preocupa os especialistas em solo. O sal do ácido fosfórico, o fosfato é um composto químico formado por fósforo e oxigênio. O fósforo é um mineral "finito e insubstituível", cujas reservas conhecidas e de exploração economicamente viável podem se esgotar em prazo de sessenta a cem anos, se for mantido o ritmo atual de crescimento do seu consumo mundial (LIU, 2006).

O fósforo não se encontra livre na natureza em nenhuma de suas variedades, mas, em combinações como os fosfatos, constitui 0,12% da composição da crosta terrestre e, em ordem quantitativa, é o duodécimo elemento químico na Terra. As matérias-primas a partir das quais se extrai o fósforo são fundamentalmente os fosfatos de metais alcalino-terrosos encontrados em depósitos de rochas de fosfato, como a clorapatita,

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$, a fluorapatita, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ ou a vivianita, $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (LIU, 2006).

2. 6 Aplicações das fitases

2.6.1 Aplicação de fitases na alimentação animal

Desde o início da década de 90, dentre as distintas enzimas utilizadas na alimentação de animais monogástricos tem-se destacado a utilização das fitases, principalmente para de aves e suínos.

Os primeiros produtos comerciais de fitases foram lançados no mercado em 1991 (GREINER et al., 2007). Atualmente, vários produtos distintos de fitase são comercialmente disponíveis (TABELA 3). As enzimas fitases podem ser incluídas na ração dos animais monogástricos em pó, líquidas ou granuladas. Fitases produzidas em escala comercial são derivadas de cepas de fungos geneticamente modificados ou usando tecnologia do DNA recombinante. As três fitases comumente usadas em ração animal pertencem a *A. niger*, que é um 3-fitase, *Peniophora lycii* e *E. coli*, que são 6-fitase. A fitase de origem fúngica tem maior estabilidade térmica e pH num ácido do que a fitase bacteriana (LIEBERT et al., 2005). Em geral, fitases de diversas fontes possuem características diferentes que devem ser consideradas antes de serem aplicadas comercialmente, como por exemplo, a fitase deve ser termo-estável ($\geq 80^\circ\text{C}$) durante a peletização da ração e possuir atividade catalítica em ampla faixa de pH.

TABELA 3. Exemplos de fitases comerciais disponíveis no mercado mundial.

Produto	Empresa	Micro-organismo	Fermentação
Natuphos	BASF	<i>A. niger</i>	Líquida
Allzyme phytase	Alltech	<i>A. niger</i>	Sólida
Phyzyme	Fermic	<i>A. oryzae</i>	Líquida
Ronozyme	Novozymes	<i>A. oryzae</i>	Líquida
Finase	AB Enzymes	<i>A. awamori</i>	Líquida
Amaferm	Biozyme	<i>A. oryzae</i>	Líquida
Bio-Feed Phytase	DSM	<i>P. lycii</i>	Líquida

(Fonte: STEFAN et al., 2005; CAO et al., 2007; SINGH, KUNZE e SATYANARAYANA, 2011)

Os animais necessitam do fósforo na dieta para atingir boa taxa de crescimento esquelético e de mineralização óssea. No entanto, o aparelho digestivo dos animais tem dificuldade de digerir e absorver o fósforo presente no fitato, pois possuem escassez de fitases no seu trato gastrointestinal. Por isso, o fosfato inorgânico é adicionado à sua alimentação e isso aumenta os custos e contribuem para a poluição ambiental presente nos excrementos dos animais.

A digestão e o aproveitamento do alimento podem ser aumentados pela adição de enzimas na alimentação, como por exemplo, pela adição da fitase microbiana. A função das fitases é realizar a hidrólise do fitato (inositol hexafosfato) em inositol e fosfato inorgânico. Desta forma, parte do fósforo, antes não disponível, passa a ser absorvido pelo organismo (PONTOPPIDAN et al., 2007).

Pesquisa realizada com a suplementação de fitase na ração de suínos resultou em uma diminuição de fósforo no esterco (ABIOYE et al., 2010 ; OMOGBENIGUN et al., 2003). Rosen (2002) reportou que a fitase presente na dieta dos frangos de corte triplicou a sua eficiência no crescimento.

Os peixes não conseguem digerir o fitato contido nas plantas por falta intrínseca de fitases gastrointestinais. Portanto, em piscicultura, estudos com truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), carpa comum (*Cyprinus carpio* L.), bagre (*Ictalurus punctatus*), salmão (*Salmo salar*), tilápia (*Oreochromis niloticus*) a fitase foi utilizada na ração para avaliar a digestibilidade dos nutrientes em diferentes fases de crescimento dos peixes e diferentes formas de suplementação (SCHAEFER e KOPPE, 1995 ; ROBINSON et al, 2002 ; LIEBERT e PORTZ, 2005 ; CAO et al., 2007).

O resultado dos estudos demonstrou que com o uso de fitases na alimentação dos peixes ocorreu um aumento da biodisponibilidade do fósforo inorgânico, do nitrogênio, proteínas e minerais e, conseqüentemente, menor poluição no ambiente aquático (DEBNATH et al., 2005; RODEHUTSCORD e PFEFFER, 1995). Portanto, a fitase é cada vez mais utilizada como um aditivo indispensável na ração dos peixes, possui um bom custo-benefício e é

ambientalmente correta. Embora a ação da fitase em ração seja comprovada em suínos, a sua utilização na alimentação dos peixes está ainda em um estágio inicial. Muitas questões fundamentais sobre a fitase devem ser elucidadas. Atividade da fitase é amplamente dependente de muitos fatores como pH e temperatura adequadas durante o processamento da ração (HAN et al., 1997).

2.6.2 Aplicação em produtos para alimentação humana

Humanos consomem grandes quantidades de cereais, legumes e sementes na sua dieta diariamente, portanto consomem grandes quantidades de fitato. Este sal e os cátions divalentes formam complexos insolúveis, dificultando a digestão dos humanos. Isto pode contribuir para uma má absorção dos minerais, proteínas e aminoácidos podendo causar malefícios para a saúde do ser humano (AFINAH et al., 2010). Recentemente, a utilização da enzima fitase em processamentos e fabricação de alimentos para está em ascensão. Além disso, fitases podem ser aplicadas na produção de alimentos funcionais ou em suplementos alimentares com propriedades benéficas para a saúde (GREINER e KONIETZNY, 2006). Pesquisas sobre este domínio concentra-se na melhoria do valor nutricional dos alimentos à base de grãos, sementes, cereais e legumes, bem como na melhoria técnica de processamento dos alimentos. A desfosforilação do fitato durante os processos de fabricação dos alimentos resulta na formação de inositol e fosfatos, com uma menor capacidade de prejudicar a absorção intestinal de minerais.

Afinah et al.(2010) e Greiner e Konietzny (2006) relataram estudos da adição de fitase na fabricação de pães. Além da redução no teor de fitato nas massas de pães, houve uma redução do tempo de fermentação pela adição da fitase, sem afetar as características das massas. Um aumento no volume do pão e uma melhoria na textura da massa também foram observados.

Porém, fitases tem que ser ativas durante todo a preparação e processamento de alimentos. A temperatura e o pH são os principais fatores determinantes da atividade enzimática. A enzima deve ser termoresistente

devido o calor gerado durante os processos dos alimentos e atividade sobre uma ampla faixa de pH (GREINER e KONIETZNY 2006).

2.7 Impacto ambiental

As dietas de animais monogástricos são suplementadas com fontes de fósforo para suprir as exigências deste mineral, aumentando os custos de produção e contribuindo para a poluição ambiental (VIVEROS et al., 2002).

A adição de fontes inorgânicas de fósforo as rações para suprir as exigências das aves, resulta em dietas com muito mais fósforo do que o necessário, resultando em excesso deste elemento excretado nas fezes. Ocorre então o acúmulo deste mineral nos solos e a ameaça à qualidade das águas (YAN et al., 2003; VATS e BANERJEE, 2004; PAYNE et al., 2005).

De acordo com Smith et al (2004), na cama de frango possui alta quantidade de fósforo, por consequencia pode levar ao aumento dele na água. A presença de fósforo em excesso na água compromete sua qualidade, pode gerar um desequilíbrio no ecossistema, ocorrendo a eutrofização, um aumento na população de algas e a liberação de compostos tóxicos por estes organismos. Além disto, o aumento na quantidade de algas pode reduzir a quantidade de oxigênio disponível na água, ocasionando um aumento na mortalidade de peixes. Ainda, tudo isto pode ser agravado pela diminuição na penetração de luz na água e na atividade fotossintética das plantas aquáticas, pelo excesso de matéria orgânica na água (FERREIRA et al., 2007). A otimização da utilização de fósforo possui um impacto econômico bastante acentuado, sendo que, além do elevado custo das proteínas, o fósforo também contribui para o aumento no preço final das formulações de rações animais (BOLLING et al, 2000). Algumas estratégias podem ser aplicadas para diminuir a sua excreção por parte dos animais, como é o caso da aplicação das fitases na alimentação animal e a concomitante redução da suplementação de fósforo inorgânico na composição dessas formulações.

2.8 Fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido (FES) pode ser definida como “processos que se referem à cultura de micro-organismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a ela está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo dos micro-organismos e, por outro, não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (LIMA et al, 2001). Outros autores a descrevem como sendo o crescimento e a produção do metabolismo de organismos em um substrato natural ou inerte que é utilizado como suporte sólido na ausência total de líquido na forma livre (PANDEY et al., 2008; RAIMBAULT et al., 1997).

PANDEY (1992) indica que processos por FES podem utilizar micro-organismos na forma de culturas puras individuais, onde se enquadra a maior parte das pesquisas nesta área, ou, mais raramente, na forma de culturas mistas.

Sabe-se que a FES é o processo mais antigo utilizado pelo homem para produzir diversos alimentos, como por exemplo o molho de soja obtido da fermentação de soja com trigo ou outro cereal, o “misso”, e o “koji” que consiste de cereais úmidos, geralmente arroz, e o crescimento do micro-organismo *Aspergillus oryzae* produzindo um complexo enzimático (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003). Portanto, a prática da FES tem sido utilizada extensivamente desde tempos antigos nos países orientais, asiáticos e africanos para produção de alimentos fermentados, e também muito estudados nos últimos anos por pesquisadores do mundo todo (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Os processos de FES têm um potencial econômico considerável na produção de produtos para as indústrias de alimentos para consumo humano e animal, farmacêutica e agrícola (PANDEY et al., 1992). Além disso, a FES apresenta grandes perspectivas de aplicação em países com abundância de resíduos agroindustriais, visto que estes podem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003).

Portanto, a FES tornou-se um processo atrativo sob diversos pontos de vista (econômico e ambiental) em diversos setores, apresentando vantagens desse tipo de fermentação para os mais variados segmentos industriais. A Tabela 4 reúne alguns exemplos de aplicações da FES.

TABELA 4. Aplicações da FES e seus produtos

APLICAÇÕES	PRODUTOS
Enzimas	Fitases, celulasas, amilases, pectinases, xilanases, proteases
Antibióticos	Penicilina
Ácidos orgânicos	Ácido cítrico, láctico, fumárico
Combustíveis	Etanol, bio-diesel
Agricultura	Biopesticidas, inseticidas, incluindo micopesticidas e bioherbicidas
Bioconversão de resíduos	Compostagem e detoxificação

Fonte: Singhanian et al., 2009 modificado

Pesquisas sobre a FES ainda estão sendo desenvolvidas para a elucidação do metabolismo microbiano e dos produtos obtidos e condições do processo. Porém, a FSm continua sendo o principal sistema de geração de produtos obtidos via fermentação em níveis industriais, sendo ainda insignificante o número de indústrias que empregam a FES para produção de metabólitos secundários, bioativos, produtos para alimentação, combustível, produtos químicos industriais e produtos farmacêuticos. O emprego do processo da FES está em expansão, criando credibilidade na biotecnologia, buscando apelo ambiental, novos modelos de biorreatores, a modelagem, simulação de processos e que poderão ser poderosas ferramentas na expansão desta tecnologia com aumento de sua aplicação industrial (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003).

A FES apresenta diversas vantagens, mas também algumas desvantagens sobre a fermentação submersa (FSm), as quais estão presentes na TABELA 5.

TABELA 5. Vantagens e Desvantagens da Fermentação no estado sólido

VANTAGENS	DESVANTAGENS
A FES se assemelha ao habitat natural dos micro-organismos e, portanto, estes preferem crescer e produzir mais produtos durante esse processo!!!	Dificuldade dos controles dos parâmetros (pH, umidade, temperatura)
<p>Maior produtividade e consequentemente, a extração e purificação são facilitadas pela alta concentração de produtos</p> <p>Melhor oxigenação devido à porosidade do substrato e aos espaços interparticulares</p> <p>Utilização de resíduos agro-industriais como substrato/suporte</p> <p>Substrato/suporte utilizado é relativamente simples, necessitando, em muitos casos, somente de adição de água e/ou fontes de nutrientes.</p>	<p>Baixa eficiência durante a homogeneização</p> <p>Aumento do calor e diminuição da umidade</p> <p>Difícil escalonamento</p> <p>Contaminação</p>
Composição de meio de cultivo simples	Difícil purificação de produtos finais, pois estão diluídas
Produção de efluentes reduzidos	<p>Modificações físico-químicas do meio de cultivo são difíceis de serem acompanhadas e controladas.</p> <p>Há uma dificuldade de coleta de amostras representativas durante o processo, devido à não homogeneidade da massa em fermentação.</p>
Baixo custo de produção	
Diminuição das contaminações devido a baixa umidade	
Baixa demanda de energia	

(Fonte: SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003 ; SINGHANIA et al., 2009 modificado)

2.8.1 Fatores que influenciam a Fermentação no estado sólido

A produtividade de um sistema de FES é afetada por diversos fatores, como por exemplo: a umidade e atividade de água, a temperatura, o micro-organismo, a aeração e o pH (LIMA et al., 2001).

O substrato/suporte utilizado durante a FES pode necessitar de pré tratamento para se adequar às condições necessárias ao crescimento e à produção de metabólitos pelos micro-organismos. A esterilização pelo calor pode causar modificação nas características do substrato, tais como textura ou qualidade nutricional, que se refletem na formação de uma massa compacta ou granular, um ressecamento da massa e, às vezes, uma adesão da massa à parede do fermentador (LIMA et al., 2001).

Durante a FES a umidade pode influenciar nos aspectos fisiológicos dos micro-organismos, tais como o crescimento, reprodução, bem como a produção e atividade de enzimas e metabólitos. A quantidade de água na FES deve ser suficiente para o desenvolvimento dos micro-organismos, sem destruir a estrutura sólida ou reduzir a porosidade do substrato ou do suporte (GERVAIS et al., 2003). Água em excesso pode provocar uma diminuição da porosidade do substrato/suporte, uma diminuição na difusão de oxigênio, além de haver risco de contaminações bacterianas. Porém, em condição de baixa umidade pode ocorrer um crescimento limitado do micro-organismo e pois há uma diminuição do acesso ao substrato e nutrientes. Durante a FES, ocorrem mudanças na atividade de água devido à perda de umidade do meio com o aumento do calor (LONSANE et al., 1985).

Uma limitação da FES é a dificuldade do controle da temperatura, ocasionado pela baixa condutividade térmica do meio sólido. O calor gerado durante a FES pode causar desnaturação dos produtos termolábeis (Santos et al., 2004). O aumento da temperatura também pode ser atribuído às atividades metabólicas dos micro-organismos, incluindo a respiração, crescimento celular e formação de produtos, ocasionando a liberação de calor. Porém, temperaturas muito baixas são desfavoráveis ao desenvolvimento dos micro-organismos e a outras reações bioquímicas (HASAN et al., 1998).

A aeração é um fator importante para o crescimento dos micro-organismos durante a FES, os quais consomem com rapidez o O_2 , dependendo da velocidade do seu fluxo através do substrato (PANDEY et al., 2000). A aeração também é importante na regulação da umidade e temperatura, na eliminação de CO_2 , distribuição do vapor de água e distribuição de compostos voláteis produzidos durante o metabolismo (GRAMINHA et al., 2008). A aeração pode afetar significativamente os níveis de produção de enzimas, algumas linhagens podem se desenvolver melhor em taxas de aeração mais elevadas, mas a produção de alguns metabólitos pode ser reduzida, e vice-versa.

O pH inicial de um cultivo sólido pode ser ajustado pela adição de uma solução tampão, por exemplo, porém a determinação exata do pH só pode ser efetuada novamente no final do processo de FES. Em alguns casos, o pH do

próprio substrato pode ser ideal para o cultivo e produção do produto desejado, sem necessidade de ajuste. De acordo com Pandey (2003) este parâmetro não é fácil de ser controlado durante a FES.

O valor de pH pode sofrer variação ao longo do processo devido às atividades metabólicas dos micro-organismos, seja por meio da síntese de ácidos orgânicos durante a fermentação e/ou a formação de outros compostos que tendem a elevar o pH (BRAND et al., 2000).

Assim, para facilitar a atuação dos micro-organismos sobre o meio de cultivo, podem ser empregados os processos de:

- Suplementação de nutrientes, para suprir a falta de algum nutriente ou adequar às melhores condições de crescimento microbiano;
- Embebição, para regular o teor de umidade inicial do processo;
- Vaporização ou aquecimento, visando a gelatinização ou inchamento do substrato;
- Adição de agente sequestrante, com o objetivo de retirar íons metálicos do meio, que podem diminuir o rendimento do processo (GARG e SHARMA, 1991).

2.9 Farelo de trigo

O trigo é uma gramínea de inverno do gênero *Triticum sp.* e o principal cereal produzido no mundo. Seu beneficiamento gera valiosos subprodutos como o farelo de trigo. Aproximadamente 6 milhões de toneladas de trigo são produzidas anualmente no Brasil e o consumo de 10 milhões de toneladas de trigo (ABITRIGO, 2011). Em 2010, a produção mundial de trigo foi 676 milhões de toneladas e o consumo de 642 milhões de toneladas de trigo (ABIMA, 2011).

Na obtenção da farinha de trigo, aproximadamente 28% do grão não é aproveitado, originando o subproduto farelo de trigo. Este farelo é basicamente composto pelo tegumento que envolve o grão, representa a parte externa do trigo, correspondente ao pericarpo ou camada de aleurona, possuindo, ainda, resíduos do endosperma farináceo. Esse subproduto é composto por farelo

fino, farelo grosso, remoído claro e remoído escuro, sendo facilmente separados nas diferentes etapas de processamento do grão. No entanto, ao término do beneficiamento todos os compostos farão parte da composição do “farelo de trigo”. Esse farelo, obtido da moagem, corresponde a um volume expressivo de produto, mas representa um material de menor valor agregado. Esse subproduto apresenta bom nível de proteína (15,52%), com base na matéria natural), entretanto, possui alta concentração de fibra (9,66%, com base na matéria seca). Os principais polissacarídeos não-amídicos (PNA) presentes na fração fibrosa deste subproduto são as arabinoxilana (36,5%), a celulose (11%), a lignina (3 a 10%) e os ácidos urônicos (3 a 6%). A composição do farelo de trigo está descrita na Tabela 6. A fração do farelo de trigo que contém ácido fítico em maior concentração é a camada de aleurona, representando 50% do farelo de trigo. O conteúdo intracelular das células da camada de aleurona é caracterizada por elevadas concentrações de fitato, proteínas, minerais, vitaminas do complexo B e lipídeos tais como esteróis de plantas (LIU et al, 2004; BURI et al, 2004).

O farelo de trigo pode representar um enorme benefício econômico, social e ambiental, sendo, portanto, motivo de intensas pesquisas em todo o mundo, com a finalidade de melhorar seu aproveitamento, e um deles é a aplicação em bioprocessos para a produção de biomoléculas de interesse econômico e industrial, já que apresenta um custo acessível (R\$ 300,00 por tonelada de farelo) (ABITRIGO, 2011).



FIGURA 3. Imagem de farelo de trigo utilizado como substrato/suporte no presente trabalho de pesquisa.

TABELA 6. Composição do farelo de trigo

Composição do farelo de trigo (Unidade valor por 100 g)	
Calorias	216,00
Proteínas (g)	15,55
Lipídeos Totais (g)	4,25
Carboidratos (g)	64,51
Fibras Totais (g)	42,80
Cálcio (mg)	73,00
Ferro (mg)	10,57
Magnésio (mg)	611,00
Fósforo (mg)	1013,00
Potássio (mg)	1182,00
Sódio (mg)	2,00
Zinco (mg)	7,27
Cobre (mg)	1,00
Manganês (mg)	11,50
Selênio (mg)	77,60
Vitamina C (mg)	0,00
Tiamina (mg)	0,52
Riboflavina (mg)	0,58
Niacina (mg)	13,58
Vitamina B6 (mg)	1,30
Folato Totais (mcg)	79,00
Vitamina B12 (mcg)	0,00
Vitamina A (IU)	9,00
Retinol (mcg)	0,00
Vitamina E (mg)	1,49
Vitamina K (mg)	1,90
Ácidos graxos, totais saturados (g)	0,63
Ácidos graxos, total mono-insaturado (g)	0,64
Ácidos graxos, total poli-insaturados (g)	2,21
Colesterol (mg)	0,00

Fonte: *Nutrient Database for Standard USDA* (2008)

2.10 Macromicetos

Há muitos anos, os macromicetos ou popularmente conhecidos como cogumelos têm sido estudados devido ao seu valor medicinal e nutricional. Os cientistas têm dado maior importância às suas propriedades farmacológicas do que ao seu papel como alimento básico. Cogumelo é o nome comum dado às frutificações de alguns fungos das divisões *Basidiomycota* e *Ascomycota* (ESPÓSITO e AZEVEDO, 2004).

Os macromicetos podem ser chamados de fungos verdadeiros ou superiores, pois apresentam corpos de frutificação (basidiomas) visíveis a olho nu. Os macromicetos são eucariontes, aclorofilados e heterotróficos, que se alimentam através da absorção de nutrientes, previamente degradados por um

rico complexo enzimático. Estes fungos excretam uma grande variedade de enzimas hidrolíticas, as quais permitem a degradação de materiais orgânicos disponíveis na natureza, sendo essencialmente importantes para manutenção do equilíbrio ecológico (BERG, 2008).

Constantemente, a humanidade tem buscado novas substâncias capazes de melhorar as funções biológicas, e assim, contribuir com a saúde da população. Estudos sobre agentes imunomoduladores, anticancerígenos, antimicrobianos, antiparasitários, antioxidantes, hipocolesterolêmicos, entre outras, provenientes de macromicetos são reportados na literatura (MORADALI et al., 2007; BARROS et al., 2007; FERREIRA et al., 2009). Esta ampla diversidade de funções terapêuticas é uma característica que torna os fungos uma rica fonte de compostos bioativos (EL-ENSHASYA, 2007).

Aproximadamente 3,5 bilhões de pessoas, cerca de metade da população mundial, utilizam suplementos alimentares como uma forma de cuidado com a saúde. Estes produtos têm sido comumente chamados de vitaminas, suplementos alimentares ou nutracêuticos. Neste contexto, por apresentarem um alto valor nutricional, os cogumelos têm sido amplamente empregados como nutracêuticos (ESPÓSITO e AZEVEDO, 2004).

Os cogumelos são considerados alimentos quase completos, ricos em proteínas, sais minerais, ferro, vitaminas B1 e B2, cálcio, fibras e outros elementos essenciais, além de apresentarem baixos teores de gordura e carboidratos. Assim, um produto nutracêutico composto por cogumelos é um extrato refinado e parcialmente definido obtido tanto do micélio quanto do corpo de frutificação, que quando consumido regularmente, apresenta propriedades terapêuticas, constituindo uma forma saudável de se prevenir contra o desenvolvimento de desordens metabólicas e a busca pelo bom funcionamento do organismo (FURLANI e GODOY, 2008; KALAČ, 2009).

Sabe-se que das 14 a 15 mil espécies de cogumelos no mundo, 700 apresentam propriedades medicinais, entretanto, estima-se que esse número chegue a 1800 espécies. Desta forma, os cogumelos representam uma vasta fonte e potencial para obtenção de novos medicamentos. Nas últimas décadas,

muitos estudos *in vitro* e *in vivo* têm sido realizados para verificar as propriedades bioativas dos cogumelos. Estudos dos seus compostos bioativos isolados têm sido realizados recentemente (MORADALI et al., 2007; ARORA, 1986).

2.11 Basidiomicetos

O reino Fungi é dividido em seis filos ou divisões dos quais quatro são de importância médica: Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota e Deuteromycota. Eles diferem entre si, principalmente, pela ontogênese (próprio desenvolvimento da espécie), filogenia, reprodução sexuada e assexuada, produção de esporos e constituição de parede celular (BERBEE e TAYLOR, 1992).

Os basidiomicetos são assim denominados por apresentarem uma estrutura característica denominada de basídio, estrutura protuberante onde são produzidos e armazenados os esporos (ALEXOPOULOS et al., 1996). Os basidiomicetos juntamente com alguns ascomicotas constituem o grupo dos Macromicetos, e são comumente chamados de cogumelos. Em geral, os basidiomicetos possuem um micélio bem desenvolvido, formado por hifas septadas, cujas paredes contêm quitina (MORADALI et al., 2007).

Esse grupo de organismos representa uma importante área a ser pesquisada, com um vasto potencial biotecnológico a ser descoberto. A importância dos cogumelos na agricultura, saúde humana e ecologia ressalta seu potencial biotecnológico para uma ampla gama de aplicações. As formas mais visíveis dessas espécies, a maioria dos quais são basidiomicetos, são seus corpos de frutificação carnudos. Embora estes sejam principalmente de valor econômico devido à sua utilização como os alimentos (a produção mundial de cogumelos comestíveis atinge quantidades de aproximadamente 2,5 milhões de toneladas anuais), os cogumelos também produzem substâncias antitumorais e imunomoduladoras, bem como as enzimas usadas para bioconversões.

2.12 *Schizophyllum commune*

Schizophyllum commune é um dos macromicetos mais encontrados da divisão basidiomiceto, chamado de cosmopolita. *S. commune* foi relatado como fungo da podridão branca. É predominantemente encontrado em galhos e madeira de árvores. O crescimento inicial do micélio ocorre sob a superfície do substrato, com formação de hifas aéreas poucos dias após a germinação. O corpo de frutificação possui de 1 a 5 cm de largura, tem forma de leque, formas irregulares, superfície superior coberto com pequenos pelos, seco, branco a cinza ou bege, sob a superfície composta de dobras, esbranquiçado a acinzentado, resistente, pálida (ARORA, 1986).



FIGURA 4. Macromiceto *Schizophyllum commune*

Fonte: <http://genome.jgi-psf.org/Schco1/Schco1.home.html>

O genoma do *Schizophyllum commune* foi sequenciado em 2010 (OHM et al., 2010). Este produz um polissacarídeo chamado 1,6- β -3-glucano, secretado pelo basidiomiceto durante o cultivo líquido. Também chamado de “schizophyllan” que tem sido usado como uma droga contra o câncer e como agente antimicrobiano (MORADALI et al., 2007; JAYAKUMAR et al., 2010).

S. commune também foi relatado como produtor de enzimas tais como β -glucosidase (DESROCHERS et al., 1981), xilanase (BRAY, 1995), celulase (HALTRICH et al., 1996), lacase (VRIES et al., 1986) e protease (SCHWALB, 1977).

2.13 Recuperação da fitase

A recuperação de enzimas, de origem microbiana, vegetal ou animal, é uma etapa complexa do processo, pois técnicas de purificação dependem das características moleculares de cada enzima. Durante o processo deve-se preocupar com a estabilidade da enzima, a eficiência da purificação, rendimento, grau de pureza. Porém, existem enzimas industriais cuja aplicação não requer elevado grau de pureza, de modo que operações cromatográficas não são necessárias, uma simples concentração do meio é suficiente para a comercialização do produto (MARSHAK et al., 1996).

Métodos de purificação de fitases têm sido relatados na literatura, como Spier et al (2011) que utilizaram cromatografias de troca iônica seguida por cromatofocalização. Greiner et al (2009) usaram os seguintes métodos de purificação da fitase: precipitação com sulfato de amônio, cromatografia por exclusão molecular, cromatografia de troca iônica e cromatografia por filtração em gel. Guo et al (2007) fizeram microfiltrações, ultrafiltrações e cromatografia de troca iônica.

A diálise é uma técnica amplamente empregada durante os processos de separação e purificação, pois permitem a troca de tampões na amostra, a dessalinização do meio contendo a amostra, como é o procedimento utilizado entre etapas cromatográficas. Consiste em um processo que separa moléculas de acordo com o seu tamanho molecular através do uso de membranas contendo poros de dimensões inferiores aos tamanhos das macromoléculas de interesse. Esses poros permitem que moléculas pequenas, tais como sais e solvente, difundam através da membrana, mais impedem a passagem de moléculas maiores. O material mais comumente usado em diálise é a celulose.

2.13.1 Cromatografia de troca iônica

O princípio básico da cromatografia de troca iônica baseia-se na competição entre íons de interesse e contaminantes pelos grupos carregados da matriz ou da fase estacionária (PESSOA JR. et al., 2005). A técnica envolve adsorção a grupos carregados da enzima, seguida de sua eluição com fracionamento. Enzimas carregam grupos ionizados em sua superfície, devido principalmente aos resíduos de aminoácidos. O balanço de cargas positivas e

negativas depende das quantidades relativas desses grupos carregados e isso varia com o pH. Quando estão em igual número, tem-se o ponto isoelétrico. Acima do ponto isoelétrico a enzima possui uma carga negativa e abaixo uma carga positiva. Desta forma, existem matrizes carregadas com grupos positivos como a resina DEAE (dietilaminoetil), chamadas de aniônicas e grupos negativos como as resinas SP-sepharose (sulfopropil) chamadas de catiônicas (LIMA et al., 2001).

O pH pode ser ajustado para regular o grau de adsorção da enzima pela resina. Uma unidade de pH acima ou abaixo do ponto isoelétrico deve ser utilizada para facilitar a adsorção. A eluição normalmente é mais eficiente quando feita através de um gradiente linear, em que o pH ou força iônica sofre uma mudança contínua (LIMA et al., 2001).

2.14 Extração Líquido-líquido

Extração líquido-líquido ou sistemas de duas fases aquosas é uma técnica empregada comumente em diversos processos industriais. Na indústria farmacêutica, a extração com solvente orgânico é usada na produção de antibióticos, como por exemplo, o ácido clavulânico. Entretanto, proteínas, organelas e fragmentos celulares, ácidos nucleicos ou mesmo células inteiras podem sofrer danos irreparáveis quando submetidas a tal processo, exigindo técnicas alternativas quando se deseja sua purificação (PESSOA e KILIKIAN, 2005; XU et al., 2001).

Os sistemas bifásicos são definidos genericamente como sistemas de duas fases líquidas imiscíveis em que o solvente principal é a água (ZASLAVSKY, 1992). Em geral, apresentam grande quantidade de água em ambas as fases, fazendo com que sejam meios muito pouco agressivos a moléculas como enzimas, por exemplo. Podem ser formados por dois polímeros hidrófilos, ou um determinado polímero com determinados sais (FIGURA 4). Acima da concentração crítica destes componentes ocorre espontaneamente a separação das fases, predominando um ou outro componente de cada um das fases resultantes (TUBIO et al., 2004).

Sistemas podem ser formados por uma mistura de um polímero sintético, por exemplo o polietilenoglicol (PEG), sal, por exemplo NaCl, e água. E também obtidos por mistura de dois polímeros, por exemplo, polietilenoglicol e maltodextrina. A distinção entre os dois tipos é feita quanto à aplicabilidade em termos das substâncias a serem purificadas e às necessidades operacionais: os primeiros tendem a serem menos viscosos, facilitando a separação das fases, enquanto os demais podem ser aplicáveis a determinadas substâncias que não toleram a presença de sais em concentrações maiores (FILHO, 2010).

Os sistemas bifásicos aquosos possuem um grande potencial para a purificação de proteínas, pois possuem uma separação seletiva, baixa tensão superficial, e um processo de baixo custo, altos rendimentos e minimização da desnaturação de proteínas (CASCONI et al., 1991).

Ultimamente, a aplicação desta técnica tem despertado interesse para a separação e purificação de proteínas, enzimas e insumos farmacêuticos.

Rabelo et al (2004) utilizaram a técnica de sistemas bifásicos para a purificação de bromelina, uma protease presente nos frutos do abacaxi. A pesquisa resultou em uma purificação da enzima diretamente a partir do seu meio de obtenção, mantendo-se sua atividade após o processo e, consequentemente, uma possibilidade de aplicação tecnológica.

Alves et al (2000) estudaram a purificação de insulina obtida de suínos, bastante semelhante à humana. A proteína foi satisfatoriamente purificada, mantendo sua atividade após o processo, o que indica o potencial de utilização desta metodologia na indústria farmacêutica.

Porto (2008) estudou a partição e purificação de ascorbato oxidase de abóbora (*Cucurbita maxima*) por extração líquido-líquido. Os resultados dos dados experimentais demonstram o potencial da aplicação do sistema de duas fases aquosas PEG/citrato para purificar a enzima utilizando coluna de discos rotativos perfurados. A melhor condição operacional neste estudo foi: massa molar do PEG 20000 (g/mol), concentração do PEG 20% (m/m), concentração de citrato 10% (m/m), velocidade dos discos rotativos 80 rpm e velocidade da fase dispersa 2 mL/min. Os resultados foram, coeficiente de partição 3,36, recuperação 152%, aumento de pureza 2,31.

Sistemas aquosos bifásicos podem ser utilizados na purificação de diversas substâncias de origem biotecnológica. Sua aplicação industrial depende de maiores estudos, indicativos da possibilidade de reciclagem dos componentes, de sua produção em escala. Várias situações já demonstraram seu potencial de uso, restando provarem-se adequados o suficiente para um investimento em tecnologias inovadoras.

2.15 Eletroforese SDS – PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) é um procedimento eletroforético que separa as proteínas com bases nos seus pesos moleculares (FIGURA 5). O SDS liga-se as proporções hidrofóbicas das proteínas, rompendo suas dobras e permitindo que elas existam em conformação estendida estável. Como resultado, o tamanho do complexo proteína-SDS é proporcional ao seu peso molecular (BRANCHT, 2003).

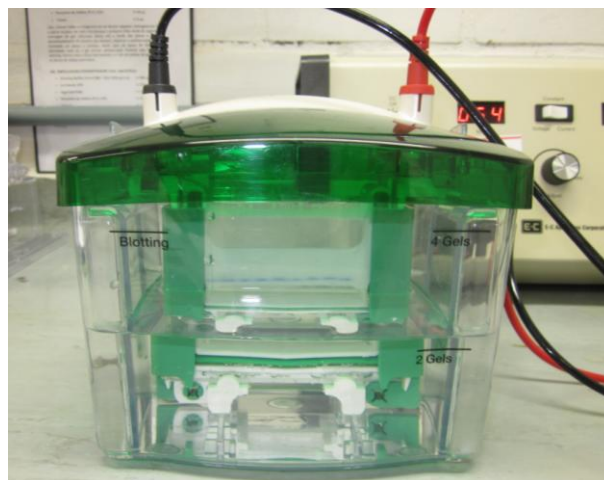


FIGURA 5. Aparato para a corrida eletroforética de proteínas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção de linhagens produtoras de fitases

Para dar início ao estudo de produção de fitases, foi realizado um estudo de seleção de linhagens de macromicetos com potencial para a produção de fitases ainda pouco estudados para a produção desta enzima. Um *screening* foi realizado para a produção de fitases em FES utilizando farelo de trigo como substratos/suporte. As cepas dos gêneros *Trametes* sp., *Pleurotus* sp., *Ganoderma* sp., *Schyzophillum* sp., *Coriollus* sp., *Grifola* sp., *Lentinula* sp. e outras linhagens de macromicetos não identificadas também foram utilizadas neste estudo e pertencem ao Banco de Culturas do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná. A produção da enzima foi avaliada por análise quantitativa dos resultados, verificando a atividade da enzima (item 3.14) no extrato enzimático bruto obtido após o processo de fermentação no estado sólido (item 3.11).

3.2 Critérios para a seleção de linhagens de macromicetos produtoras de fitases

Os critérios utilizados para a seleção da linhagem produtora utilizada nos estudos posteriores desta pesquisa são: produção considerável da enzima fitase (item 3.14), velocidade de crescimento da linhagem no substrato selecionado, facilidade de manuseio, repicagem, e velocidade de crescimento em um meio sólido.

3.3 Manutenção das linhagens

As linhagens foram repicadas e mantidas em tubos contendo meio PDA (ágar batata dextrose) inclinado previamente esterilizados em autoclaves à 121°C por 15 minutos e conservados à 4°C. Para a manutenção destas linhagens, foram realizados repiques a cada dois meses. A partir dos tubos, as linhagens foram repicadas por fragmentos de 5 mm x 5 mm de micélios, em placas de Petri contendo o mesmo meio PDA previamente esterilizados. As placas foram incubadas em estufa na temperatura de 30°C. O período de crescimento dos micélios variaram, de 5 a 10 dias, dependendo da espécie de

macromiceto. Após o crescimento do micélio (análise visual), as placas foram armazenadas sob refrigeração (4°C).

3.4 Identificação morfológica

Primeiramente, a cepa escolhida como promissora para a produção de fitase, foi selecionada para a indução do corpo de frutificação para realizar a identificação macroscópica, por meio do estudo morfológico através do qual permite identificar o gênero e espécie do macromiceto. O inóculo foi preparado (item 3.10) para crescimento dos pellets em meio líquido. Posteriormente, 200 g de milho e 100 g de grão moído de trigo foram lavados em água destilada e manteve-se com água por algumas horas para o amolecimento dos grãos. No dia seguinte, os grãos foram lavados em água destilada para eliminação de sujidades.

Em um béquer de 4000 mL, os grãos de milho foram cozidos durante 30 minutos. Escorreu-se a água com o auxílio de uma peneira até o resfriamento.

Adicionou-se então 1 % p/p de carbonato de cálcio (em relação ao peso seco dos grãos) e o farelo de trigo. Homogeneizou-se e distribuiu-se em sacos de polipropileno, preenchendo até 2/3 do volume. Os sacos foram fechados com tampão, papel Kraft e elástico. Estes foram esterilizados em autoclave a 121°C, 1 atm, por 1 hora e 30 minutos. Após o resfriamento, pellets formados em cultivo líquido foram inoculados (em condições assépticas em fluxo laminar). Tamparam-se os sacos novamente, e estes foram homogeneizados. Os sacos foram incubados em estufa a 30°C até o crescimento total do micélio. Observou-se diariamente o crescimento do micélio. A indução da frutificação foi feita expondo o micélio sob fotoperíodo (luz e ausência de luz) durante 5 dias e incubação em temperaturas mais baixas. Aproximadamente 20 dias depois, houve a frutificação do cogumelo. Este foi coletado com o auxílio de um bisturi e armazenado em um recipiente estéril. Para a identificação taxonômica, observou-se as características macroscópicas dos basidiomas ainda frescos e das microestruturas (basídios, basidiosporos, cistídios e hifas).

3.5 Seleção de substratos/suporte para produção de fitase por fermentação em estado sólido

Diversos grãos de cereais e resíduos da agroindústria brasileira foram testados para a produção de fitase utilizando o processo de fermentação no estado sólido (FES). Estes produtos apresentam considerável teor de ácido fítico e alguns possuem reduzido teor de fósforo inorgânico, o que poderiam apresentar potencial indutor para a produção de fitases (Spier et al 2010). Dentre eles farelo de trigo, trigo integral, grão moído de trigo, arroz integral, farelo de soja, casca de café, centeio, milho, polpa cítrica, farelo de trigo + grão de trigo moído (1:1) e cevada. O objetivo foi avaliar a capacidade da linhagem selecionada de sintetizar a enzima fitase (3.14) utilizando esses produtos e subprodutos agroindustriais.

3.6 1º Pré-tratamento do substrato selecionado

O primeiro pré-tratamento do substrato farelo de trigo foi realizado com o objetivo de aumentar a produção de fitase pela redução do teor de fósforo inorgânico presente no substrato. O experimento foi conduzido submetendo substrato à lavagem em água à 50°C por 5 minutos, posteriormente filtrado em tecido TNT. As condições de lavagem foram as seguintes: substrato *in natura* sem lavagem, substrato lavado uma vez, substrato lavado 2 vezes e farelo de trigo lavado 3 vezes. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. Após as lavagens, o substrato selecionado farelo de trigo foi submetido a um segundo pré-tratamento, descrito abaixo (item 3.7).

3.7 2º Pré Tratamento do substrato selecionado

O farelo de trigo foi submetido a um segundo pré-tratamento para avaliar a melhor condição para reduzir a contaminação microbiana, já que os substratos utilizados na fermentação neste estudo não poderiam ser submetidos à esterilização (em autoclave). Estudos realizados por Spier et al (2008), a esterilização provoca a degradação do ácido fítico, presente no substrato. Os experimentos foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de

250 mL contendo o 10 g de farelo de trigo como substrato/suporte para FES. A umidade e o pH foram ajustados a 50% (m/m) e 7,0, respectivamente. O primeiro estudo de pré-tratamento foi realizado utilizando algumas condições de esterilização em calor seco brando em substituição à esterilização. Os frascos contendo substrato úmido e com pH ajustado foram submetidos às seguintes condições: 1) incubação em estufa à 60°C / 4 horas; 2) 80°C / 4 horas; 3) vapor fluente à 100°C / 15 minutos, 4) 121°C/15 minutos em autoclave. Em seguida, o conteúdo dos frascos foi inoculado com “pellets” filtrados, cuidadosamente homogeneizados e incubados a 30°C por 72, 96 e 120 horas. Amostras representativas foram coletadas para a análise da atividade da fitase descrito no item 3.14. As fermentações foram realizadas em duplicata.

3.8 Caracterização físico química do substrato/suporte selecionado para a produção de fitase

Análises físico-químicas do farelo de trigo e do farelo de trigo tratado (item 3.6 e 3.7) foram realizadas. Os parâmetros avaliados foram: cinzas em mufla a 500°C por 8 horas, e umidade em estufa a 105°C, analisados pelo método termogravimétrico, proteínas pelo método de KJELDAHL (1883) e extração de lipídeos pelo método Soxhlet (AOAC, 1990). O pH das amostras foi determinado com auxílio de um pHmetro de bancada (HD107BC), suspendendo 1 g de substrato em 10 mL de água deionizada por 5 minutos. O teor de carboidratos foi determinado pelo somatório dos resultados acima subtraídos de 100.

3.9 Determinação da capacidade de absorção máxima de água do substrato

A capacidade de absorção máxima de água pelo substrato foi realizada pelo seguinte método:

Pesou-se 10 g de substrato seco e adicionou-se 1 mL a 1 mL de água, com intervalos de repouso de 30 minutos. A mistura foi mantida em repouso

por 1 hora e observou-se a absorção de água pelo substrato. Determinou-se o volume de água máximo absorvido pelo material sólido sem que houvesse o aparecimento de água livre.

3.10 Preparo do Inóculo

As cepas de macromicetos produtores de fitase foram inoculadas em meio líquido chamado Czapek modificados (glicose 30 g, extrato de levedura 6 g, fosfato de potássio monobásico 1 g, sulfato de magnésio 0,5 g, sulfato de ferro 0,01 g para 1 litro de meio de cultivo) previamente esterilizados. Utilizaram-se 5 fragmentos de micélio (5 mm x 5 mm) os quais cultivados em placas e então inoculados em 100 mL do meio em frascos de Erlenmeyer de 250 mL. Os frascos foram incubados em um agitador do tipo *shaker* à 30°C, 120 rpm, por 72 horas. Após o crescimento dos pellets, estes foram filtrados em tecido TNT instalado em uma peneira de inox como suporte previamente esterilizados. Este procedimento foi realizado no fluxo laminar.

3.11 Produção da enzima por fermentação em estado sólido

A fermentação no estado sólido foi realizada em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 10 g de substrato/suporte inoculados com 2,5% (p/v) de “pellets” filtrados (umidade de 93%) com umidade ajustada a 50% e pH 7. Todo o conteúdo dos frascos foi homogeneizado com auxílio de uma espátula esterilizada e os mesmos foram incubados à 30°C por no mínimo 72 horas. O tempo de fermentação variou e as análises de atividade enzimática foram realizadas a cada 24 horas. As fermentações foram realizadas em duplicata e as análises de atividade enzimática (item 3.14) em triplicata.

3.12 Otimização do bioprocesso para a produção de fitase

A otimização das variáveis independentes (temperatura, pH, taxa de inóculo, fonte de carbono e fonte de nitrogênio) para o processo de fermentação no estado sólido para a produção de fitase foi realizada (TABELA

7). Um delineamento experimental fatorial fracionado Box–Behnken design foi utilizado sendo composto por 5 fatores, 3 níveis (+1, 0, -1) e 5 pontos centrais (0) totalizando 37 experimentos. O software estatístico “Stat 5.0” (Stasoft, Inc) foi utilizado para a obtenção do planejamento experimental e análise dos resultados.

TABELA 7. Níveis das variáveis independentes e seus níveis decodificados

VARIÁVEIS	-1	0	+1
A (Temperatura, °C)	27	30	33
B (Sacarose, %)	0	2,5	5
C (Extrato de levedura, %)	0	7	14
D (pH)	5	6	7
E (Taxa de inóculo, %)	2,5	5	7,5

3.13 Extração sólido-líquido da enzima fitase

O meio fermentado contido nos frascos foi submetido ao processo de extração sólido-líquido (FIGURA 6) para a recuperação da enzima produzida conforme descrito abaixo:

a) Pesou-se uma quantidade representativa (5 g) do fermentado utilizando água ultra pura com pH corrigido para 7,0 a 4°C, seguindo uma relação de extração de 1:10 (massa de meio fermentado (g) : volume de água ultra pura (mL)).

b) Os substratos fermentados foram macerados por 3 minutos utilizando o gral e pistilo, posteriormente filtrados em tecido TNT submetidos à pressão mecânica manual;

c) O líquido filtrado foi centrifugado a 4500 g por 15 minutos a 4°C;

d) Separou o sobrenadante, chamado de extrato bruto da enzima, o qual foi mantido sob refrigeração (4°C) para posteriores estudos e análises.

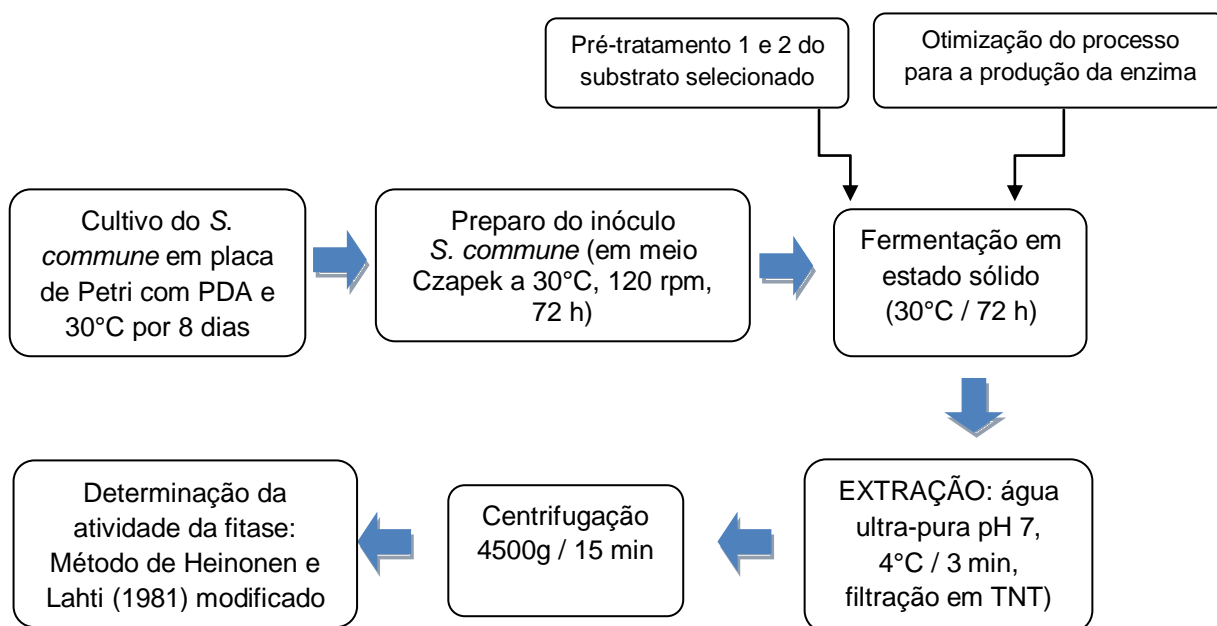


FIGURA 6. Fluxograma do processo de fermentação em estado sólido

3.14 Atividade enzimática

A determinação da atividade da fitase foi medida pela liberação de fósforo inorgânico de acordo com a metodologia descrita por Heinonen e Lahti, (1981) com algumas modificações, expressa em U/gbs (unidades por grama de substrato fermentado seco). 350 μ L de substrato (fitato de sódio 2.5 mM (Sigma) em 0.2 M de tampão acetato de sódio, pH 5.0) foram previamente incubados a 50°C por 5 minutos, e adicionada uma alíquota de 50 μ L de enzima. A reação ocorreu em banho-maria à 50°C por 30 minutos. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 1,5 mL de solução de AAM (10 mM de molibdato de amônio: 5N de H₂SO₄: acetona na proporção 1:1:2) e 100 μ L de ácido cítrico. Uma unidade de enzima (U) foi capaz de liberar um μ mol de fosfato inorgânico por minuto. Todas as análises foram realizadas em triplicata e a leitura em espectrofotômetro à 355 nm.

3.15 Determinação de proteínas (atividade específica)

O teor de proteínas das amostras foi determinado conforme metodologia descrita por Bradford (1976). A reação continha 100 µL de amostra e 1000 µL de reagente Bradford submetido a reação por 5 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro a 595 nm. Para o cálculo da concentração de proteínas, foi utilizada uma curva padrão com 0 – 0,1 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA). Os resultados para a atividade específica de fitase foram expressos em U/mg (unidades de atividade enzimática por mg de proteína).

3.16 Determinação do teor de umidade

A determinação de umidade das amostras foi realizada de acordo com as Normas do Instituto Adolfo Lutz (1995) pelo método gravimétrico.

3.17 Caracterização do extrato bruto contendo fitase produzida por *S. commune*

3.17.1 Efeito do pH na atividade da fitase

O pH ótimo da reação enzimática (descrito no tem 3.17) foi determinado usando diferentes soluções tampões: pH 1,0-3,5 (0,1M glicina-HCl), pH 4,0-5,5 (0,1M acetato de sódio-HCl), pH 6,0-7,0 (0,1M Tris-ácido acético), pH 7,5-8,5 (0,1M Tris-HCl), 9,0-10,0 (0,1M glicina-NaOH). A determinação da atividade da fitase (U/gbs) do extrato bruto do *S. commune* foi realizada com a reação enzimática em diferentes valores de pH de 1,0 a 10,0. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.17.2 Efeito do pH na estabilidade da fitase a 4°C

O extrato bruto contendo fitase de *S. commune* foi ajustado em diferentes valores de pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 e armazenado à 4°C, por 24, 48, 72 e 96 horas. As amostras foram submetidas ao ensaio enzimático após esses intervalos de tempo. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Este estudo foi conduzido para verificar a estabilidade da enzima durante possíveis etapas de separação (como nas cromatografias de troca iônica), submetidas a diferentes valores de pH à temperatura de refrigeração.

3.17.3 Efeito da temperatura na atividade da fitase

A termo-tolerância da fitase foi determinada incubando o extrato bruto enzimático em banho-maria por 30 minutos nos seguintes intervalos de temperatura: 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90°C. Após a incubação a atividade da fitase foi determinada pelo método descrito no item 3.14. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.17.4 Inativação térmica da fitase e determinação da constante k e meia vida da enzima

A estabilidade térmica da fitase foi determinada incubando o extrato bruto enzimático em banho-maria a 50°C pelos seguintes intervalos de tempo: 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. Após a incubação a atividade da fitase foi determinada pelo método descrito no item 3.14. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A constante k foi calculada a partir do coeficiente angular do gráfico formado pelo logaritmo natural da % de atividade enzimática residual pelo tempo de incubação (ANGELO, 1995). A taxa de inatividade enzimática foi determinada pela reação de primeira ordem, obtida através das seguintes equações:

$$\%A = \%A_0 e^{-kt} \quad (1)$$

$$\ln \frac{\%A}{\%A_0} = -kt \quad (2)$$

Onde, A_0 = atividade enzimática inicial e A = atividade enzimática residual.

A meia vida da enzima, que corresponde ao tempo necessário para que a atividade enzimática seja reduzida à metade da atividade inicial, foi calculada através da equação:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{0.693}{k} \quad (3)$$

A qual resultou da seguinte equação (para a inativação enzimática que obedece à equação simples de primeira ordem):

$$\ln\left(\frac{1}{2}\right) = k t_{\frac{1}{2}} \quad (4)$$

3.17.5 Influência dos íons metálicos na atividade da fitase

A inibição ou ativação da atividade da fitase por diferentes íons metálicos foi avaliada em soluções de extrato bruto enzimático contendo a concentração final de 1 mM dos seguintes íons na forma dos sais sulfatos e cloretos: K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mo, Co^{2+} , Ni^{2+} , Na^+ , acetato e citrato.

3.17.6 Efeito da concentração de fosfato inorgânico na atividade da fitase

Para estudar o efeito da concentração de fosfato inorgânico na atividade da fitase durante a reação enzimática, diferentes concentrações de fosfato inorgânico (0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 mM) foram utilizadas. A atividade da fitase foi determinada pelo método de Heinonen e Lahti modificado (conforme descrito no item 3.14).

3.17.7 Determinação das constantes de Michaelis-Menten (K_m) velocidade máxima ($V_{máx}$) e afinidade enzima-substrato

Para a obtenção dos valores de K_m e $V_{máx}$ os ensaios de atividade enzimática foram realizados utilizando as seguintes concentrações: 0,4, 0,8, 1,2, 1,6, 2,0, 2,4, 2,8, 3,2, 3,6, 4,0, 4,4, 4,8 e 5,2 mM do substrato fitato de sódio

(Sigma). A atividade da fitase foi medida conforme o item 3.14. Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram obtidos a partir do método de linearização de Lineweaver–Burk.

3.17.9 Efeito da concentração de NaCl

O efeito da concentração de NaCl na atividade enzimática foi realizado em diferentes concentrações (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10% p/v). Estas soluções foram utilizadas para diluir o extrato bruto contendo a enzima. Após 48 horas de armazenamento a temperatura ambiente, o ensaio enzimático foi realizado conforme o item 3.14 descrito anteriormente.

3.17.10 Estudo da estabilidade da fitase em diferentes condições de armazenamento

Alíquotas do extrato bruto contendo fitase foram armazenadas em microtubos do tipo “*ependorfs*” em diferentes condições: temperatura ambiente ao abrigo da luz ($26^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$), temperatura de refrigeração (4°C) e temperatura de congelamento (-18°C). Este estudo foi conduzido por 5 meses, com análises feitas semanalmente. O ensaio enzimático foi realizado conforme descrito anteriormente no item 3.14. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.17.11 Estudo do incremento da estabilidade da fitase com adição de aditivos no extrato bruto

Diferentes aditivos foram adicionados ao extrato bruto enzimático para avaliar os seus efeitos na estabilidade da fitase durante o armazenamento a temperatura ambiente ($26^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$) (TABELA 8). Os agentes estabilizantes e suas concentrações foram determinados conforme a literatura (ROWE et al., 2005)

TABELA 8. Aditivos e suas respectivas concentrações no extrato bruto enzimático

Aditivos*	Concentração mínima (% p/v)	Concentração média (% p/v)	Concentração máxima (% p/v)
A	0,25	0,5	1
B	0,025	0,05	0,1
C	0,025	0,05	0.1
D	0,0125	0,025	0,05
E	0,25	0,5	1
F	0,25	0,5	1
G	0,00075	0,0015	0,003
H	0,025	0,05	0,1
I	0,01	0,005	0,0025

* Os aditivos estão protegidos por patente.

Soluções aquosas com os aditivos A, B, C, D, E, F, G H e I foram misturadas em três diferentes concentrações finais com o extrato bruto contendo a fitase do *S. commune* (TABELA 8). O ensaio enzimático foi realizado semanalmente por 60 dias. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.18 Cinética de produção de fitase em FES

O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de fitase em FES por *S. commune* em frascos de Erlenmeyer durante 128 horas nas condições de fermentação otimizadas (33°C, 10% de sacarose, 7,5% de inóculo e pH 7) . Em intervalos de 6 horas de fermentação foram coletadas amostras para analisar: a atividade da fitase, concentração de açúcares totais pelo método Somogyi-Nelson, pH, umidade das amostras fermentadas e a determinação da biomassa microbiana.

3.18.1 Determinação de açúcares totais

3.18.1.1 Hidrólise das amostras fermentadas

Pesou-se 1 g de cada amostra fermentada em um balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se cerca de 50 mL de H₂O, 2 mL de ácido clorídrico concentrado em banho-maria com água em ebulição durante 20 minutos para a hidrólise. Em seguida, o conteúdo foi resfriado e neutralizado com NaOH a 40%. Completou-se o volume com H₂O no balão volumétrico de 100 mL e posteriormente todas as amostras foram filtradas.

A metodologia de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1945) foi utilizada para analisar o consumo de açúcares durante a fermentação de *S. commune* para a produção de fitase. Após a aplicação desta metodologia procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 535 nm. As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados obtidos com base na curva padrão de glicose de 0 a 100 µg/mL de glicose P.A.

3.18.2 Determinação da biomassa microbiana

A biomassa foi determinada indiretamente pelo método de quantificação de ergosterol (componente da parede celular dos fungos) nas amostras fermentadas, que foram coletadas a cada 6 horas até o tempo de fermentação de 128 horas. O método envolveu a extração de ergosterol com n-hexano e analisado por cromatografia líquida de alta performance - HPLC conforme Seitz (1979) com algumas modificações. Esta metodologia foi realizada com 1 g de fermentado, 4 mL de etanol e 2 mL de NaOH 2 M incubadas em banho-maria a 70 ° C por 1 hora. Em seguida, 4 mL de HCl 1 M e 2 mL de 1 M KHCO₃ e 4 mL de n-hexano foram adicionados. A mistura foi então agitada vigorosamente. As amostras foram centrifugadas a 4500 g por 5 minutos e foram coletados na fase superior (n-hexano). Após a adição de mais 4 mL de n-hexano, uma segunda centrifugação foi realizada em 4500 g por 3 minutos. Pelo menos, a adição de mais 2 mL de n-hexano, uma terceira centrifugação foi realizada em 4500 g por 2 minutos. Todos os sobrenadantes foram armazenados em um

recipiente protegido da luz e aberto para a evaporação do solvente (n-hexano). Os extratos foram ressuspensos em 500 µL n-hexano, filtrados em membrana de PVDF e analisados em um HPLC Varian ProStar utilizando uma coluna C18 e detector de arranjo de diodos ajustado para 282 nm. Injetou-se 10 µL de amostra com o auxílio de uma seringa. As fases móveis empregadas foram metanol (0-3 minutos), acetonitrila (3-10 minutos) e metanol (10-15 minutos) todos com alto grau de pureza com taxa de fluxo de 1 mL / minuto. Como padrão, foi utilizada uma solução de ergosterol PA (Sigma) com 1000 µg / mL, com diluições de 500, 250 e 125 µg / mL. Este ensaio foi validado para medir tanto o peso da biomassa seca quanto o teor de ergosterol. A biomassa foi cultivada em um meio de crescimento, lavada com água ultra pura, seca em estufa (dentro de um frasco contendo sílica-gel) e o teor de ergosterol foi determinado. A taxa de recuperação de extração do ergosterol foi também considerada neste ensaio.

3.19 Recuperação da fitase

3.19.1 Extração líquido-líquido

Os parâmetros avaliados para extração líquido-líquido da fitase de *S. commune* foram: massa molar, concentração do PEG, pH e concentração do citrato. A enzima fitase foi obtida por FES (item 3.11). Em tubos de centrífuga graduados com volume de 15 mL, contendo as quantidades de PEG e sal citrato conforme o planejamento fatorial completo, foram adicionados o extrato bruto enzimático contendo fitase. Para ajustar a concentração final do PEG e citrato, foi adicionada água ultra pura para atingir a massa total do sistema.

As misturas foram agitadas em vortex por 1 minuto e ficaram em repouso por 1 hora para obter a separação total das fases. Posteriormente foram feitas medições dos volumes das fases separadas. Com o auxílio de uma micropipeta as mesmas foram separadas e armazenadas em microtubos para realizar as análises da atividade da fitase e de proteínas totais.

Um planejamento fatorial completo (2^4) (TABELA 9) foi realizado com um total de 20 experimentos com quatro pontos centrais, os quais possibilitaram

calcular a recuperação, aumento de pureza e coeficiente de partição da enzima fitase. A TABELA 9 mostra a seleção de quatro variáveis em diferentes níveis selecionadas para a extração. Os resultados das análises estatísticas foram realizados com o auxílio do Statistica 8.0 *software*. A melhor condição foi definida como aquela que proporcionou a melhor combinação entre as respostas.

TABELA 9. Variáveis e níveis do planejamento fatorial completo 2^4 do SDFA da extração da fitase de *S. commune*.

Variáveis	Níveis		
	+1	0	-1
Concentração do citrato % (m/m) - Citrato	18	16	14
Massa Molar do PEG % (g/mol) - MMPEG	1500	6000	10000
Concentração do PEG % (m/m) CPEG	22	20	18
pH	5	6	7

Este estudo permite selecionar variáveis e as respectivas concentrações que influenciam no sistema de duas fases aquosas (SDFA) da fitase para complementar estudos futuros.

Aumento de Pureza (AP)

O aumento de pureza da fitase foi determinado pela razão entre as atividades específicas na fase PEG e na amostra antes da extração.

$$AP = \frac{A_{e1}}{A_{ei}}$$

Onde: A_{e1} = atividade específica na fase extraída PEG – (U/mg) ; A_{ei} =atividade específica da amostra antes da extração (U/mg); AP = aumento de pureza

Recuperação da fitase (Y)

A recuperação da atividade da fitase foi determinada pela razão entre a atividade volumétrica da fase superior (PEG) e a atividade volumétrica no extrato bruto, ambas multiplicadas pelo seu volume.

$$Y = \left(\frac{A_t \cdot V_t}{A_i \cdot V_i} \right) \times 100$$

Onde: A_t e A_i são atividades enzimáticas (U/gbs) na fase superior (PEG) e no extrato bruto (antes da partição), respectivamente; V_t e V_i são os volumes na fase superior e do extrato bruto em mL, respectivamente.

Coeficiente de partição da fitase (K)

A distribuição da fitase entre as fases do SDFA foi caracterizada pelo coeficiente de partição, que foi calculado pela expressão:

$$K = \frac{A_t}{A_b}$$

Onde: A_t e A_b são atividades enzimáticas na fase superior (PEG) e inferior (Citrato) (U/gbs), respectivamente.

3.19.2 Clarificação do Extrato Bruto

O extrato bruto contendo a enzima fitase proveniente da FES foi submetido a uma clarificação utilizando carvão ativo em pó P.A. (Vetec) em coluna de vidro (altura de 25 cm e diâmetro de 3,5 cm). 4 g do carvão ativo foi misturado em 200 mL de extrato bruto sob agitação lenta à temperatura ambiente. Adicionou-se a mistura na coluna de vidro contendo lã de vidro para conter o carvão. Após o empacotamento do carvão ativo, amostra foi retirada com o auxílio de uma bomba peristáltica com fluxo de 1 mL/min (Pump P-1 GE Healthcare Bioscience). Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 10.000 g /

10 minutos / 4°C. O sobrenadante foi filtrado com um filtro de 0,45 µm com o auxílio de uma bomba à vácuo.

3.19.3 Ultrafiltração

15 mL do extrato bruto enzimático clarificado foram ultrafiltrados em membranas de ultrafiltros de 30, 50 e 100 KDa (Amicon Ultra/Milipore) sob centrifugação a 4500 rpm / 20 minutos / 4°C. As amostras foram separadas e denominadas de F (filtrado ou permeado) e R (retido) para determinação da atividade de fitase através do método descrito anteriormente (item 3.14).

3.19.4 Diálise

Após a clarificação do extrato bruto, a amostra foi dialisada em membrana de celulose 76 mm (Sigma Aldrich) contra solução tampão acetato de amônio 15 mM pH 7, sob agitação branda a 4°C. A amostra foi mantida durante 24 horas a 4°C, com trocas da solução tampão durante o processo.

3.19.5 Cromatografia de troca iônica

O extrato bruto clarificado foi submetido à cromatografia de troca aniônica em uma coluna empacotada com resina DEAE–Sephrose (Pharmacia Biotech, Suécia) previamente equilibrada com solução Tris-HCl 20 mM pH 7. A coluna foi carregada com o extrato bruto clarificado diluído 1:1 com a solução Tris-HCl 20 mM ajustado a pH 7. Posteriormente a coluna foi lavada com a mesma solução anterior e então as proteínas adsorvidas foram eluídas por um gradiente de concentração de NaCl de 0 a 0,5 M com solução de Tris-HCl 20 mM e Tris-HCl 20 mM contendo NaCl 1M, a 4°C. As amostras foram coletadas com o auxílio do coletor de frações automático (modelo SuperFrac, GE Healthcare, Suécia) em tubos de vidro. Frações de 10 mL foram coletadas e então procedeu-se à análises de densidade óptica D.O. As frações que obtiveram as maiores valores de D.O. foram submetidas ao ensaio enzimático

da atividade da fitase. As frações com maior atividade de fitase foram dialisadas (conforme descrito anteriormente).

A segunda etapa da purificação da fitase de *S. commune* utilizou-se uma resina de troca catiônica *SP-Sepharose Fast Flow* (Pharmacia Biotech, Suécia). A coluna foi pré-equilibrada com tampão glicina-HCl 20 mM (pH 3,9) e carregada com 70 mL de extrato obtido após a cromatografia anterior (previamente ultrafiltrado em membrana de 10 kDa). Este foi diluído na proporção 1:1 no mesmo tampão. Em seguida, a coluna foi lavada para remoção dos compostos não adsorvidos à coluna. Um formador de gradiente de concentração de 0 a 0,5 M de NaCl foi realizado para eluir as diferentes proteínas adsorvidas na coluna. Esta etapa foi realizada com uma taxa de fluxo de 1 mL/min. Frações contendo 5 mL de eluído foram coletadas em um coletor de frações automático (SuperFrac - GE Healthcare, Suécia) e analisadas a sua densidade óptica D.O. em espectrofotômetro à 280 nm. As frações que obtiveram as maiores absorbâncias foram submetidas ao ensaio para determinação da atividade de fitase e dosagem de proteínas. As frações com máxima atividade obtida foram misturadas, dialisadas e armazenadas a 4°C para posteriores análises.

3.19.6 Liofilização

As amostras dialisadas foram previamente congeladas em *ultra-freezer* (U 570 Premium / New Brunswick Scientific) -80°C por 24 horas em microtubos de 2 mL.

3.19.7 Eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (p/v) Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) foi realizada conforme a metodologia descrita por Laemmli (1970). O experimento foi realizado com o kit de eletroforese da BIO-RAD. O marcador molecular SM0431 (Fermentas) contendo os respectivos padrões e pesos moleculares foi utilizado: β -galactosidase (116 KDa) albumina sérica bovina (66,2 KDa), ovoalbumina (45 KDa), anidrase carbônica (34 KDa), REase Bsp 98I (25 KDa), β -lactoglobulina (18,4 KDa), lizoenzima (14,4 KDa). A

amostra foi corrida em voltagem de 100 V (0,015 amperes) e o gel foi corado com azul de *Coomassie blue* R-250.

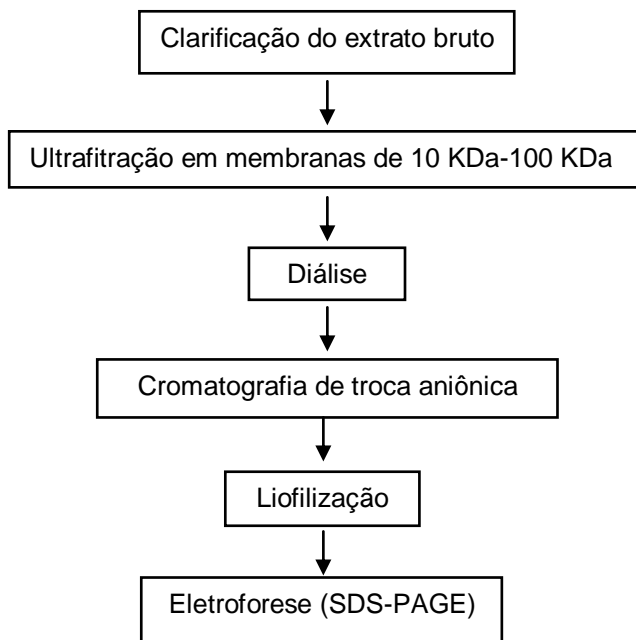


FIGURA 7. Fluxograma das etapas de recuperação da fitase

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção de linhagens de macromicetos produtores de fitases

A seleção de macromicetos produtores de fitase foi realizada utilizando o processo de fermentação no estado sólido usando o farelo de trigo como substrato/suporte. 80 linhagens de macromicetos foram testadas e 6 linhagens apresentaram produção de fitase extracelular (TABELA 10) acima de 40 U/gbs. A atividade da fitase foi avaliada em 72 horas de fermentação. A umidade do farelo de trigo foi ajustada a 50% p/p com água com pH 7, definidos após estudos prévios. A linhagem *Trametes versicolor* apresentou atividade da fitase 134,53 U/gbs (unidades de atividade por grama de fermentado na base seca). Os 74 outros cogumelos não mostraram atividade significativa.

O macromiceto *S. commune* foi escolhido nesta pesquisa para o estudo da produção de fitase, mesmo tendo apresentado menor produção de fitase (40,73 U/gbs) devido a escassez de estudos com esta espécie na literatura. Além disso, este macromiceto apresentou fácil manuseio, do meio de inóculo e rápida velocidade de crescimento em processo de FES.

TABELA 10. Linhagens de macromicetos selecionados para a produção de fitases em 72 horas de fermentação

Linhagens de macromicetos	Atividade de fitase (U/gbs)
<i>Schizophyllum commune</i>	40,73
<i>Ganoderma applanatum</i>	95,26
<i>Ganoderma stipitatum</i>	97,19
<i>Grifola frondosa</i>	53,25
<i>Trametes versicolor</i>	134,53
<i>Lentinula edodes</i>	99,55

4.2 Identificação morfológica

A identificação morfológica do corpo de frutificação de *S. commune* (FIGURA 8) foi realizada pelo biólogo naturalista André August Remi de Meijer, o qual realizou análises macroscópicas e microscópicas. "As características do gênero *Schizophyllum* sp. são: basidiocarpo pleurotóide e coriáceo, himenóforo consistindo de lamelas comprimidas radialmente produzindo efeito de uma

margem lamelar partida; hifas não infladas e não-amilóides; basidiósporos lisos, hialinos e não-amilóides. Dentro do gênero, *S. commune* é caracterizado pela cor muito pálida do basidiocarpo, a ausência de cystídios himeniais e a presença de grampos de conexão." (A A R de Meijer, comunicação pessoal).



FIGURA 8. Fotografia do cultivo de *Schizophyllum commune* para indução do corpo de frutificação utilizado para a identificação macroscópica

4.3 Seleção de substratos/suporte para a fermentação em estado sólido

A seleção de um substrato/suporte adequado para a produção da enzima fitase é um fator primordial e um passo extremamente significativo, pois os substratos fornecem energia necessária e suporte para o crescimento do micro-organismo para produzir o metabólito desejado (PANDEY, 2001; PAPAGIANNI, 2000, EL-BATAL, 2001). Pandey et al (1999 e 2000) e Kim et al (1998) descreveram que o farelo de trigo possui potencial como substrato para produção de fitase em FES.

O farelo de trigo é um resíduo agroindustrial muito comum utilizado para fins de produção de enzimas por fungos filamentosos em fermentação em estado sólido (PANDEY, 1994). Ele contém a maioria dos componentes vitais, tais como carbono, nitrogênio e fontes de aminoácidos necessários para os

fungos. Assim, além de farelo de trigo outros resíduos da agroindústria foram testados como substrato para a produção de fitase durante a FES (TABELA 11).

TABELA 11. Resultados da seleção de substratos em FES 72, 96 e 120 horas, para produção de fitase por *Schizophyllum commune*

Substratos	Produção de fitase (U/gbs)		
	72 h	96 h	120 h
Farelo de trigo	40,73	22,1	19,91
Farelo de soja	16	20	16
Casca de café	6,13	7,73	29,07
Polpa cítrica	2,45	19,05	13,94
Milho	7,37	22,18	43,32
Arroz	2,18	0,05	0,05
Cevada	1,22	1,46	1,7
Centeio	0,94	0,93	1,47
Farelo de trigo + grão de trigo moído (1:1)	17,88	34,14	36,32

Todos os substratos sólidos investigados resultaram na produção de fitase por *S. commune* significativamente menor em comparação com farelo de trigo (41 U/gbs) em 72 horas de fermentação, apesar de substratos tais como polpa cítrica (2,45 U/gbs), farelo de soja (16 U/gbs) e casca de café (6,13 U/gbs) também se mostrarem apropriados para a produção desta enzima. O tempo de fermentação ótima de 72 horas onde a atividade atingiu 41 U/gbs de farelo de trigo. Este resultado foi 1,85 vezes maior do que a atividade enzimática obtida em 96 h (22,09 U/gbs). No entanto, substratos como centeio e cevada apresentaram menor produção da enzima (≤ 2 U/gbs) ao longo do processo fermentativo.

Roopesh et al (2006) reportaram que o micro-organismo *Mucor racemosus* NRRL 1994 produziu 9 U/g utilizando farelo de trigo como substrato/suporte para a produção de fitase. A mistura de substratos farelo de

trigo e grão moído de trigo (1:1) teve um resultado de produção de fitase inferior ao de farelo de trigo, 17,88 U/gbs, se comparado ao presente trabalho. O milho como substrato resultou em uma boa produção de fitase 43 U/gbs, porém em 120 horas de fermentação, ou seja, com menor produtividade.

4.4 1º Pré-tratamento do substrato selecionado

O objetivo deste estudo foi avaliar as influências das lavagens do farelo de trigo na produção de fitase: a diminuição do fósforo inorgânico contido no substrato/suporte selecionado e a diminuição da contaminação microbiana durante a FES. A FIGURA 9 demonstra que o farelo de trigo lavado uma vez com água ultra pura a 50°C por 5 minutos foi o que propiciou um aumento na produção de fitase (14 %) tendo sido eficaz para a remoção do excesso de fósforo inorgânico (FIGURA 9). As sucessivas lavagens de substratos resultaram em uma diminuição na produção de fitase. Duas lavagens do farelo de trigo levaram a uma diminuição na produção de fitase (7 %). Com três lavagens ocorreu a diminuição em 20% da produção de fitase comparando com o farelo de trigo lavado uma vez. Esta etapa de lavagem do substrato pode propiciar a redução do teor de fosfato inorgânico no farelo de trigo.

O farelo de trigo sem lavar resultou em 0,13 milimol de fósforo inorgânico por minuto (mmol P / min). O teor de fosfato inorgânico no farelo de trigo lavado uma vez tem 0,090 mmol P / min, o farelo de trigo lavado duas vezes tem 0,015 mmol P / min e farelo de trigo lavado três vezes foi de 0,006 mmol P / min de fosfato inorgânico. Os pré-tratamentos dos resíduos agroindustriais são indicados para remover o excesso de fosfato inorgânico, o qual inibe a produção de fitase (NIGAM e PANDEY, 2009). Bhavsar et al. (2010) estudaram a influência do pré-tratamento dos resíduos agroindustriais na produção de fitase de *A. niger* NCIM 563. O substrato farelo de trigo foi lavado em água destilada e os resultados indicaram diminuição da quantidade de fosfato inorgânico propiciando a produção da enzima. Neste estudo, o farelo de trigo antes do pré-tratamento tinha 4,02 mg / g de fosfato e após o pré tratamento passou a ter 0,56 mg / g de fosfato.

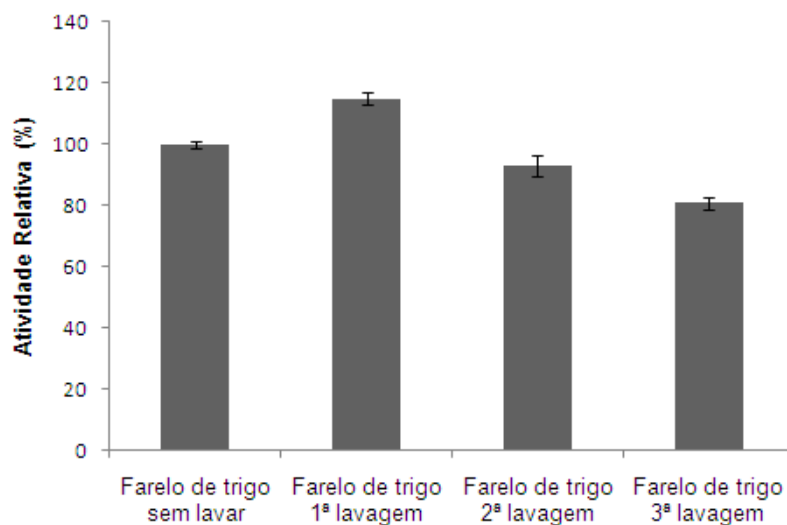


FIGURA 9. Estudo da influência do 1º pré tratamento no farelo de trigo na produção de fitase por *S. commune* em 72 horas de FES.

4.5 2º Pré-Tratamento do substrato selecionado

O farelo de trigo submetido ao 1º pré-tratamento (uma lavagem) foi tratado termicamente em diferentes condições para reduzir a contaminação microbiana e evitar a degradação do substrato ácido fítico. O substrato/suporte selecionado foi incubado à 60°C por 4 horas, 80°C por 4 horas, 100°C vapor fluente por 15 minutos, 120°C a 1 atm em autoclave por 15 minutos. A FIGURA 10 mostra que o tratamento térmico do farelo de trigo influencia a produção de fitase de *S. commune*. O melhor resultado, 38 U/gbs de atividade de fitase, foi observado quando o substrato foi incubado por 4 horas a 80°C. Altas temperaturas de secagem e a autoclavagem do substrato resultou em uma baixa produção de 1 U/gbs de atividade de fitase, pois degradam o substrato fitato da enzima. Spier (2008) sugeriu em seu estudo que devem ser realizados pré-tratamentos em substratos/suportes em FES em substituição a autoclavagem para evitar ou minimizar a degradação do ácido fítico presentes nestes materiais. Também tem sido uma prática de pré-tratamento (químico ou físico), de alguns dos substratos antes da utilização em processos de FES (exemplo: ligno-celulose), tornando-os mais acessíveis para o crescimento

microbiano (PANDEY et al., 1999) ou então para a indução ou promoção da produção da biomolécula ou metabólito de interesse.

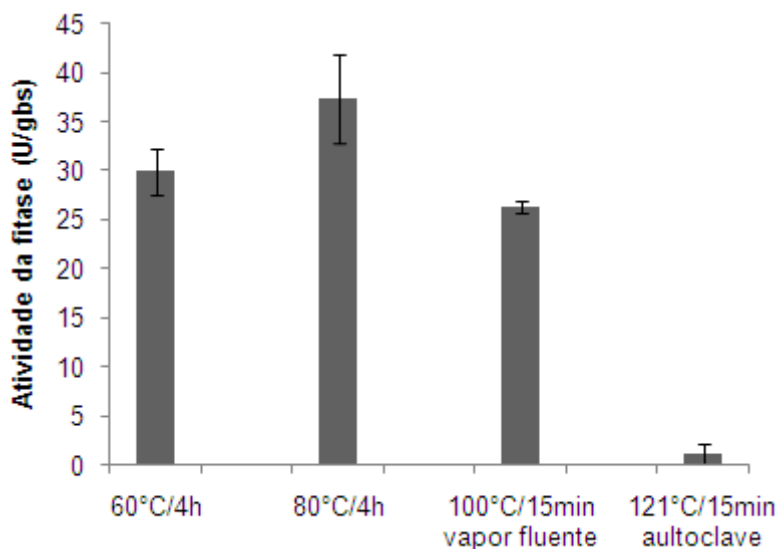


FIGURA 10. Estudo da influência do 2º pré tratamento do farelo de trigo na produção de fitase por *S. commune* em 72 horas de FES.

4.6 Caracterização físico-química do substrato/suporte selecionado para produção de fitase

A Tabela 12 apresenta a composição centesimal do farelo de trigo cru, “in natura”, sem tratamento e o farelo de trigo tratado utilizados durante a FES para produção de fitase neste trabalho.

Na TABELA 12 estão descritas as características físico-químicas do farelo de trigo “in natura” e o farelo de trigo pré-tratado. Resíduos agroindustriais podem ser ricos em nutrientes, e também podem ser empregados em FES para produção de enzimas (COUTO e SANROMÁN 2005), o que é o caso do farelo de trigo cru que apresentou elevado teor de carboidratos (58,91%), e o farelo de trigo pré-tratado de 58,28% de carboidratos. O pH para o farelo de trigo “in natura” e farelo de trigo pré-tratado próximo a neutralidade, o que pode propiciar o crescimento do basidiomiceto *S. commune*, além da produção da fitase. Mesmo após o pré-tratamento de lavagem, não houve diferenças significativas nas características físico-químicas entre o farelo de trigo “in natura” e o farelo de trigo pré-tratado. Observou-se

somente uma diminuição do fósforo inorgânico de 0,13 mmol P / min do farelo de trigo “in natura” para 0,09 mmol P / min do farelo de trigo pré-tratado.

TABELA 12. Composição centesimal do farelo de trigo “in natura” e o farelo de trigo pré-tratado

	Farelo de trigo (%)	Farelo de trigo pré-tratado (%)
Carboidratos	58,91	58,28
Proteínas (Kheldahl)	16,82	16,88
Lipídeos (Soxlet)	3,45	3,53
Cinzas	5,69	5,67
Umidade	15,13	15,64
pH	6,44	6,06
Fósforo inorgânico	0,13 mmol P/min	0,09 mmol P/min

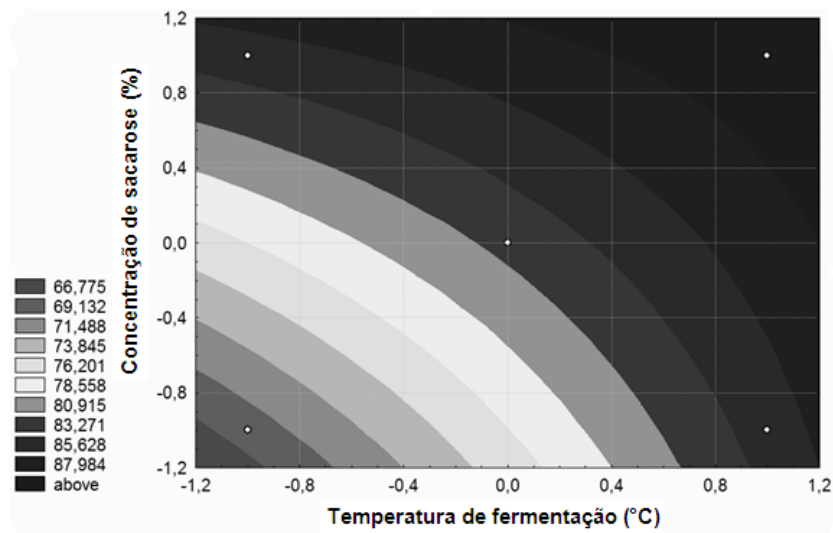
4.7 Otimização do bioprocesso para a produção de fitase

Após a seleção dos fatores por estudos preliminares de taxa de inóculo, fonte de carbono e nitrogênio (estudos prévios), a interação entre alguns parâmetros do processo foram avaliados por meio da otimização da produção de fitase em FES utilizando um planejamento experimental fracionado 3⁵, com 32 experimentos e 5 pontos centrais totalizando 37 experimentos. Este estudo de otimização avaliou as seguintes variáveis independentes: temperatura de fermentação (°C), concentração de sacarose (%), concentração de extrato de levedura (%), pH e taxa de inóculo (%), utilizando a ferramenta superfície de contorno. As análises dos resultados foram feitas pelo programa *Statistica 5.0* (TABELA 13).

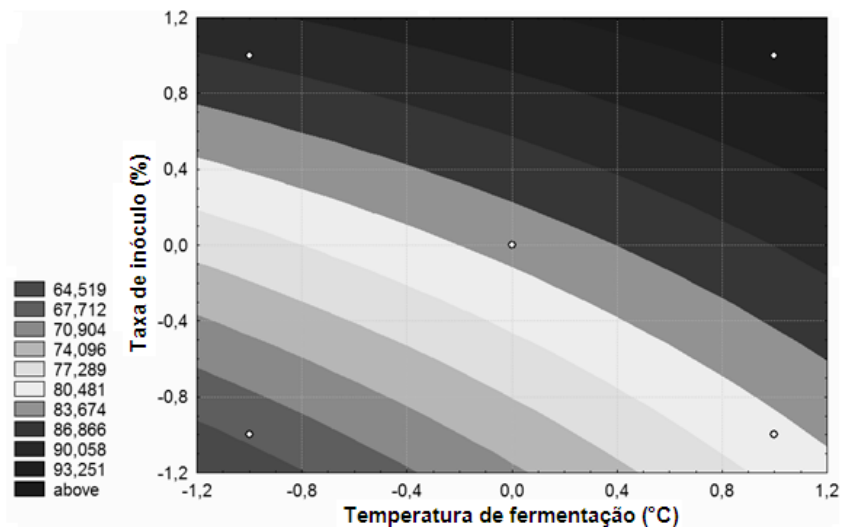
TABELA 13. Resultados da produção de fitase (U/gbs) com 37 experimentos utilizando o planejamento experimental fracionado 2⁵ para análise estatística

Experimento	Fatores					
	Temperatura (°C)	Sacarose (%)	Extrato de levedura (%)	pH	Taxa de inóculo (%)	Atividade de fitase (U/gds)
1	1 (33)	1 (5)	1 (7)	1 (7)	1 (7,5)	105,31
2	1 (33)	1 (5)	1 (7)	1 (7)	-1 (2,5)	68,98
3	1 (33)	1 (5)	1 (7)	-1 (5)	1 (7,5)	80,40
4	1 (33)	1 (5)	1 (7)	-1 (5)	-1 (2,5)	61,76
5	1 (33)	1 (5)	-1 (0)	1 (7)	1 (7,5)	113,76
6	1 (33)	1 (5)	-1 (0)	1 (7)	-1 (2,5)	89,20
7	1 (33)	1 (5)	-1 (0)	-1 (5)	1 (7,5)	102,22
8	1 (33)	1 (5)	-1 (0)	-1 (5)	-1 (2,5)	95,70
9	1 (33)	-1 (0)	1 (7)	1 (7)	1 (7,5)	79,84
10	1 (33)	-1 (0)	1 (7)	1 (7)	-1 (2,5)	71,37
11	1 (33)	-1 (0)	1 (7)	-1 (5)	1 (7,5)	86,22
12	1 (33)	-1 (0)	1 (7)	-1 (5)	-1 (2,5)	85,96
13	1 (33)	-1 (0)	-1 (0)	1 (7)	1 (7,5)	105,10
14	1 (33)	-1 (0)	-1 (0)	1 (7)	-1 (2,5)	78,59
15	1 (33)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (5)	1 (7,5)	83,49
16	-1 (27)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (5)	-1 (2,5)	86,02
17	-1 (27)	1 (5)	1 (7)	1 (7)	1 (7,5)	106,72
18	-1 (27)	1 (5)	1 (7)	1 (7)	-1 (2,5)	45,57
19	-1 (27)	1 (5)	1 (7)	-1 (5)	1 (7,5)	77,63
20	-1 (27)	1 (5)	1 (7)	-1 (5)	-1 (2,5)	64,49
21	-1 (27)	1 (5)	-1 (0)	1 (7)	1 (7,5)	113,65
22	-1 (27)	1 (5)	-1 (0)	1 (7)	-1 (2,5)	86,03
23	-1 (27)	1 (5)	-1 (0)	-1 (5)	1 (7,5)	105,01
24	-1 (27)	1 (5)	-1 (0)	-1 (5)	-1 (2,5)	69,66
25	-1 (27)	-1 (0)	1 (7)	1 (7)	1 (7,5)	89,96
26	-1 (27)	-1 (0)	1 (7)	1 (7)	-1 (2,5)	60,77
27	-1 (27)	-1 (0)	1 (7)	-1 (5)	1 (7,5)	59,50
28	-1 (27)	-1 (0)	1 (7)	-1 (5)	-1 (2,5)	96,18
29	-1 (27)	-1 (0)	-1 (0)	1 (7)	1 (7,5)	89,71
30	-1 (27)	-1 (0)	-1 (0)	1 (7)	-1 (2,5)	38,03
31	-1 (27)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (5)	1 (7,5)	58,29
32	-1 (27)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (5)	-1 (2,5)	52,09
33	0 (30)	0 (2,5)	0 (3,5)	0 (6)	0 (5)	83,77
34	0 (30)	0 (2,5)	0 (3,5)	0 (6)	0 (5)	75,25
35	0 (30)	0 (2,5)	0 (3,5)	0 (6)	0 (5)	74,62
36	0 (30)	0 (2,5)	0 (3,5)	0 (6)	0 (5)	73,67
37	0 (30)	0 (2,5)	0 (3,5)	0 (6)	0 (5)	85,75

A



B



C

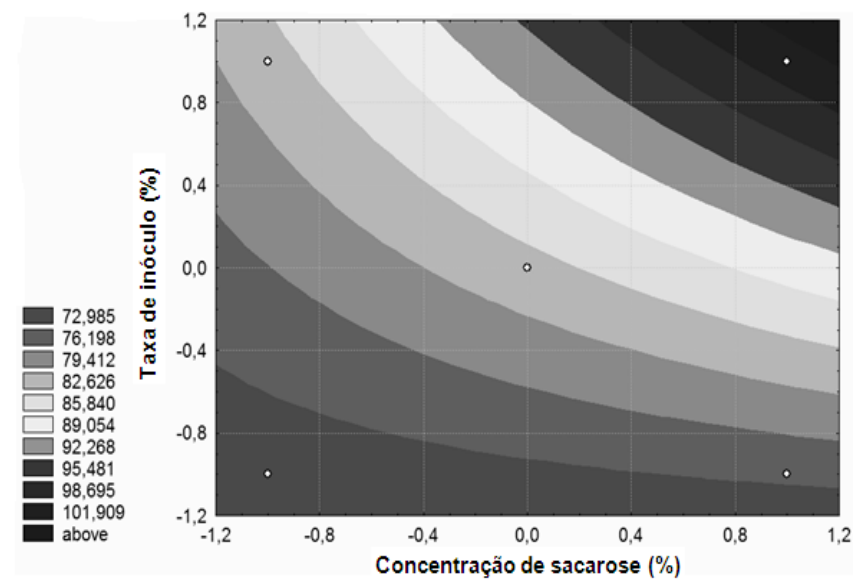


FIGURA 11. **A** - Superfície de contorno apresentando a região ótima de produção de fitase com as variáveis independentes significativas: concentração de sacarose e temperatura de fermentação; **B** – Superfície de contorno apresentando a região ótima de produção de fitase e os valores de taxa de inóculo e temperatura de fermentação; **C** - Superfície de contorno apresentando a influência da concentração de sacarose 5% e a taxa de inóculo 7,5 % na produção de fitase.

O modelo matemático gerado para a produção de fitase após análise de variância (ANOVA), apresenta a relação entre a produção de fitase e a temperatura de fermentação (A), a concentração de sacarose (B), extrato de levedura (C), pH (D) e taxa de inóculo (E). A produção de fitase (Z) pode ser predita pelo modelo a seguir:

$$Z = 81.29 + 11.29A^* + 10.31B^* - 7.86C + 4.87D + 19.15E^* - 5.21AB - 6.41AC - 1.07AD - 4.3AE - 12.67BC^* + 4.16BD + 8.76BE^* - 2.82CD - 2.83CE + 14.03DE^*$$

*efeitos significativos

Onde: Z = atividade de fitase, U/gbs; A = temperatura de fermentação, °C; B = concentração de sacarose, %; C = concentração de extrato de levedura, %; D = pH; E = taxa de inóculo, %.

Os resultados de produção de fitase variaram de 38,03 a 113,76 U/gbs (TABELA 13). Os resultados experimentais mostraram que a atividade da fitase máxima foi de 113,76 U/gbs (experimento nº 5) com uma temperatura de 33°C, 5% de sacarose, pH de 7,0 e 7,5% de taxa de inóculo e 0% de extrato de levedura. As superfícies de contorno estão apresentadas na FIGURA 11 (A), (B) e (C), que indicam as regiões para uma melhor produção de fitase. Outro resultado satisfatório foi do experimento nº 21, no qual a produção de fitase atingiu 113, 65 U/gbs em temperatura de 27°C, 5 % de sacarose, pH de 7,0 e 7,5% de taxa de inóculo, o que mostra que não houve diferença significativa, ou seja, a temperatura de incubação para a produção de fitase pode variar de 27°C a 33°C. Os experimentos nº 30 e 18 mostraram resultados inferiores de produção de fitase em relação aos demais. O experimento nº 30 apresentou

uma produção de fitase de 38 U/gbs, provavelmente devido à temperatura de fermentação 27°C e a principal razão da suplementação de sacarose na FES.

Os valores menores que o erro ao nível de significância $p < 0,05$ ou $< 5\%$ das variáveis e interações estudadas indicam que há diferença significativa (FIGURA 12) discutir os resultados dos efeitos mais significativos. Quanto menor o valor p , maior a influência desse fator em relação aos demais. De acordo com os resultados mostrados na TABELA 14, observou-se que todos os fatores estudados foram significativos ao nível de 5% ou 0,05 de significância.

O extrato de levedura quando em combinação com a temperatura, sacarose, pH e taxa de inóculo não apresentou efeito significativo na produção enzimática. Ao analisar a influência deste fator (extrato de levedura) na produção de fitase, observou-se que não é significante nas condições estudadas neste delineamento experimental. Geralmente as fontes de nitrogênio inorgânicas são mais facilmente assimiladas do que as fontes de nitrogênio orgânicas (HONG, 2001). No entanto, a sacarose influenciou a produção de fitase mostrando uma tendência de aumento da produção conforme o aumento de sua concentração, de acordo com a FIGURA 11 A.

O coeficiente de determinação é usado normalmente como uma medida de ajuste e deve ser próximo de 1,0 para um bom modelo estatístico. Um $R^2 = 0,81$ significa que 81% dos dados experimentais levantados sobre a produção de fitase foi compatível com os dados previstos pelo modelo. Valores inferiores a 0,05 indicam que os termos do modelo são significativos enquanto valores superiores a 0,1000 indicam que os termos do modelo não são significativos. A atividade da fitase foi afetada pela temperatura ($p = 0,007355$), a concentração de sacarose ($p = 0,013088$) ($p = < 0,0010$) e inóculo em conformidade com os estudos relatados por Spier et al (2011) os quais também verificaram que os mesmos fatores apresentaram efeitos significativos sobre produção de fitase em FES, ainda que o fungo estudado seja de outro gênero e espécie. Um aumento na temperatura de fermentação (11,29 A), concentração de sacarose (10,31 B) e a taxa de inóculo (19.15E) apresentou um efeito positivo na síntese da enzima, enquanto um aumento na concentração de extrato de levedura (não

significativo) teve um efeito negativo sobre a atividade da enzima. Entre todas as interações, somente AD mostrou-se significativa ao nível de 5% em termos lineares e quadráticos de A, D, F e termo o quadrático de B.

Na FIGURA 11 A observa-se na superfície de contorno que a produção de fitase aumenta conforme o aumento da concentração de sacarose e da temperatura de fermentação. Observa-se nas superfícies de contorno que a produção de fitase aumenta com o aumento dos valores das variáveis independentes.

Com a otimização do processo de produção de fitase de *S. commune* 113 U/gbs, houve um aumento de 2,85 vezes (285%). A produção de fitase de *A. niger* NCIM 563 usando farelo de trigo como substrato/suporte, aumentou três vezes a sua produção após a otimização (BHAVSAR et al., 2010). Foi reportado pela literatura a otimização da suplementação do farelo de trigo, utilizado na FES, produziu 1,6 vezes mais fitase de *A. ficuum* NRRL 3135 (BOGAR et al., 2003). A produção de fitase de *Sporotrichum thermophile* Apinis em fermentação em estado sólido, usando resíduo de gergelim como substrato, alcançou 2,6 vezes mais fitase devido à otimização do processo (SINGH e SATYANARAYANA, 2008).

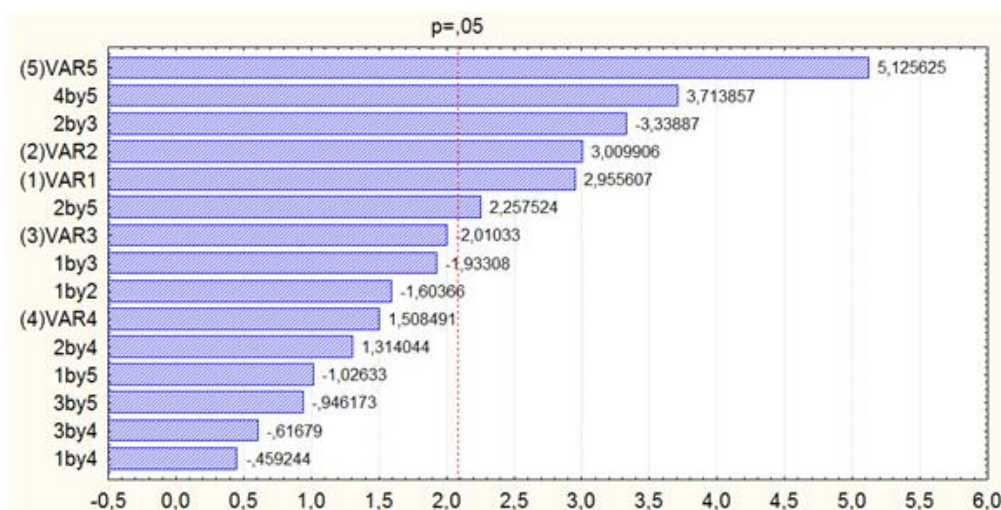


FIGURA 12. Gráfico de Pareto apresentando as variáveis e as interações significativas da otimização da produção de fitase por *S. commune*. Onde (1) temperatura de fermentação °C; (2) concentração de sacarose %; (3) concentração de extrato de levedura % (4) pH; (5) taxa de inóculo %.

TABELA 14. Efeito estimado durante a otimização

Variável	Efeito	p
Interação	81,2990	0,000000
A – temperatura de fermentação (°C)	11,2920 [*]	0,007355 [*]
B – concentração de sacarose (%)	10,3101 [*]	0,013088 [*]
C – concentração de extrato de levedura (%)	-7,8690	0,050736
D – pH	4,8732	0,212692
E – taxa de inóculo (%)	19,1500 [*]	0,000060 [*]
A x B	-5,2179	0,183329
A x C	-6,4108	0,105893
A x D	-1,0738	0,779605
A x E	-4,3057	0,268822
B x C	-12,6799 [*]	0,003192 [*]
B x D	4,1691	0,283848
B x E	8,7641 [*]	0,031351 [*]
C x D	-2,8227	0,464558
C x E	-2,8370	0,462338
D x E	14,0378 [*]	0,001391 [*]

^{*} Estatisticamente significativo

$R^2 = 0,81$; $R^2_{adj} = 0,67$

4.8 Caracterização da fitase de *S. commune*

4.8.1 Efeito do pH na atividade da fitase

A atividade da fitase foi testada na faixa de pH entre 1,0 a 10,0 utilizando fitato de sódio como substrato. O pico de atividade de fitase produzida por *S. commune* foi encontrado em pH 5,0 (FIGURA 13), sendo este o seu pH ótimo da fitase de *S. commune*. A fitase incubada em pH 5,0 apresentou um declínio na atividade. Comparando com dados encontrados na literatura, a fitase de *Aspergillus niger* ATCC 9142 apresentou pH ótimo de 5,0 (CASEY e WALSH 2003). Resultado similar foi obtido de fitase de *A. Niger* FS3, que apresentou um pH ótimo em 5,5 (SPIER et al., 2010). O valor de pH em torno de 5,0-6,0 é característico para a maioria de fitases de fungos e bactérias (VOHRA e SATYANARAYANA, 2003). Também a fitase de *A. biosporus*, um cogumelo

comestível, apresentou um pH ótimo de 5,5 (COLLOPY e ROYSE, 2004). Um ponto interessante a ressaltar é que a fitase de *S. commune* mostrou uma atividade significativa em pH 5,0, que pode facilitar a degradação do fitato já nas glândulas salivares (pH 5,0-7,0) (CASEY e WALSH, 2004).

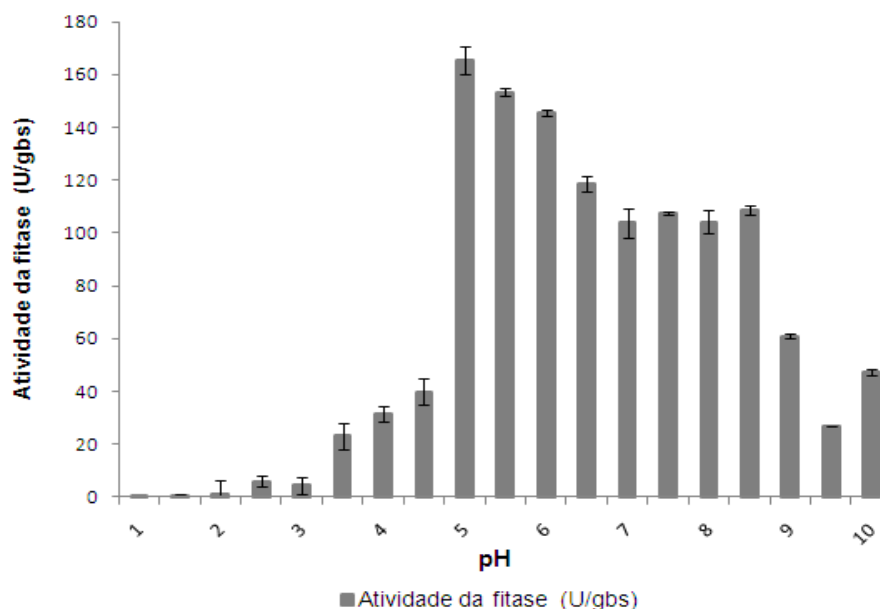


FIGURA 13. Efeito de diferentes valores de pH durante a reação enzimática para a determinação do pH ótimo da enzima

4.8.2 Efeito do pH na estabilidade da fitase a 4°C

O efeito do pH na estabilidade da enzima deve ser levado em conta pois tal fator pode influenciar a ligação do substrato a enzima e na catálise enzimática. Os sítios ativos das enzimas são frequentemente compostos por grupos ionizáveis que devem se encontrar numa forma iônica adequada para que mantenham a conformidade do sítio ativo, liguem-se aos substratos, e/ou catalisem a reação. Além disso, os substratos podem conter grupos ionizáveis e somente uma forma iônica deste substrato pode se ligar a enzima ou sofrer a catálise (BORZANI, et al., 2001). A estabilidade da fitase do cogumelo *S. commune* contida no extrato bruto foi avaliada durante o armazenamento a 4°C em diferentes valores de pH em 24, 48, 72 e 96 horas (FIGURA 14). Após 72 horas, em pH 6,0, a fitase manteve-se 100% estável à 4°C. Em pH 2 e 9 houve uma queda na atividade da enzima.

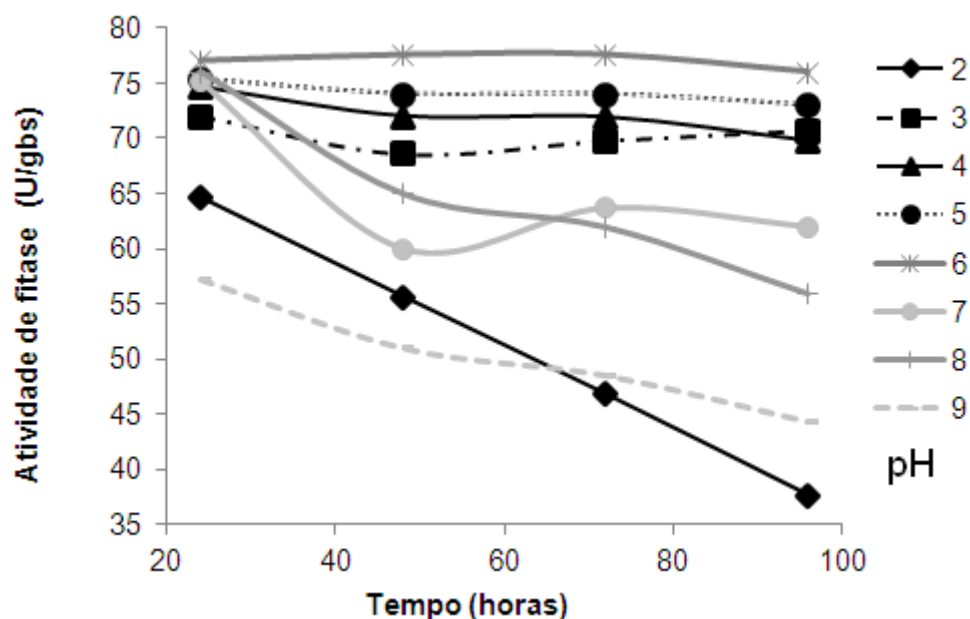


FIGURA 14. Efeito de diferentes valores de pH na estabilidade da fitase durante 24, 48, 72 e 96 horas de armazenamento a 4°C.

Segundo estudos de Tadashi et al (2001), a fitase I, de *Monascus* também foi estável na faixa de pH 5,5-6,5 e a fitase II obteve melhor estabilidade na faixa de pH 6,0 a 7,0. Já as fitases de *Pseudomonas sp.* foram mais estáveis em pH 4,0, onde a atividade remanescente foi de aproximadamente 90-92%, armazenadas a 4°C por 2 horas (SRI-AKKHARIN, 2004). A atividade relativa da fitase de *A. niveus* atingiu 130,5% em pH 5,6 e 136,4% em pH 5,6 para *M. sulfurea* (EL-GINDY et al., 2009). Fitase II de *A. niger* mostrou estabilidade na faixa de pH 3,5-9,0 em temperatura ambiente por um período de 12 horas de incubação (SONI et al., 2010). A atividade da fitase sobre o pH 3,0-5,5 e a estabilidade em condições ácidas do r-APPA de *Yersinia kristeensenii* obteve-se em condição de baixo pH no estômago a 37°C por 3 horas (FU et al., 2008).

4.8.3 Efeito da temperatura na atividade da fitase

As enzimas apresentam uma temperatura ótima na qual tem uma atividade constante por um determinado período de tempo. A temperatura ótima da fitase de *S. commune* demonstrou a fosforilação do fitato em 50°C

durante reação enzimática de 30 minutos (FIGURA 15). À 60°C a fitase reteve 56% de sua atividade, enquanto a enzima manteve 37% de sua atividade à 70°C por 30 minutos. Nessa temperatura, a estabilidade da fitase é semelhante aos resultados da fitase de *A. niger* FS3, que manteve 40% da atividade à 70°C (SPIER et al., 2010). A fitase de *S. commune* praticamente perdeu a sua atividade total à 80°C, porém com características comparáveis às estudadas na literatura. De acordo com Konietzny e Greiner (2002); Boyce e Walsh (2007), a maioria das fitases microbianas estudadas apresentaram temperaturas ideais semelhantes dentro de uma faixa de temperatura de 45-55°C. Woodzinski e Ullah (1996) relataram a inativação térmica da fitase de *Aspergillus fumigatus* à 70°C. A maioria das fitases fúngicas caracterizadas até o momento apresentam temperatura ótima na faixa de 50-60°C (CASEY e WALSH, 2004). A fitase K1 do *Aspergillus oryzae* apresentou temperatura ótima a 50°C (SHIMIZU, 1993).

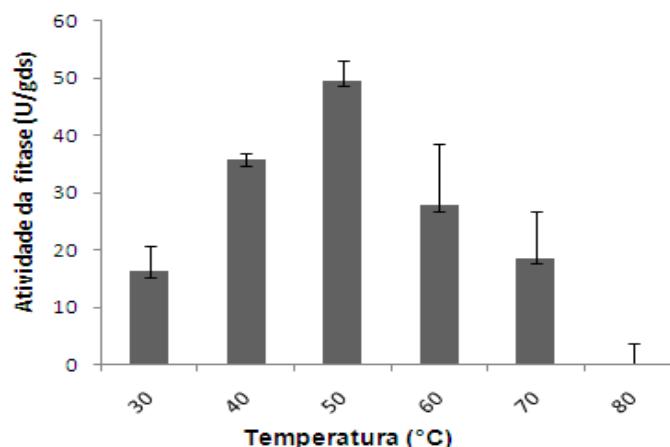


FIGURA 15. Efeito de diferentes temperaturas na atividade da fitase durante a reação enzimática.

4.8.4 Inativação térmica da fitase, determinação da constante k e meia vida da enzima

A constante k e a meia vida da enzima foram calculadas para fitase presente no extrato bruto da FES de *S. commune* que apresentou um valor equivalente a $0,0143 \text{ min}^{-1}$ e meia vida de 48 min à 50°C (FIGURA 16). Neste estudo, não se obteve resultados satisfatórios, pois os valores encontrados

foram menores do que outros estudos reportados na literatura. Jermutus et al., (2001) à 49°C de incubação, resultou em meia vida de 138 min da fitase de *A. niger* e 53 min para fitase de *A. terreus*. Fitase de *A. niger* resultou em uma meia vida de 30 minutos à 65°C (VATS e BANERJEE, 2005). À 60°C a meia vida da fitase de *Sporotrichum thermophile* é 16 horas e em 80°C possui meia vida de 1,5 horas (SINGH e SATYANARAYANA, 2009).

A desnaturação de enzimas pela ação do calor deve-se as interações protéicas com o meio aquoso, sendo assim, as enzimas são geralmente mais estáveis em soluções concentradas (do que diluídas). Num estado seco ou predominantemente desidratado (por exemplo, enzimas liofilizadas) as enzimas permanecem ativas por períodos consideráveis, até mesmo acima de 100°C (SAMBORSKA et al., 2005). Esta propriedade possui grande significado em processos tecnológicos enzimáticos.

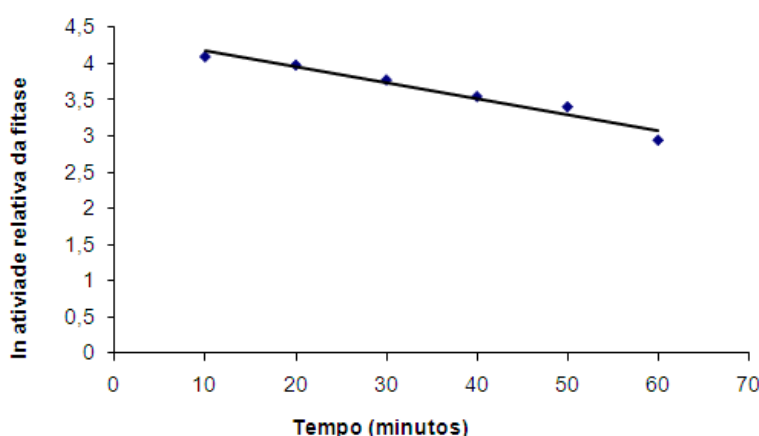


FIGURA 16. Inativação térmica da fitase à 50°C.

4.8.5 Influência dos íons metálicos na atividade da fitase

Os resultados da influência da presença de íons metálicos sobre a atividade da fitase no extrato bruto enzimático são apresentados na TABELA 15. A atividade da fitase relativa foi calculada considerando a atividade enzimática sem a adição de íons (controle), equivalente a 100% de atividade relativa. A maioria dos íons metálicos na concentração testada (1mM) apresentaram efeito potencialmente significativo, com exceção do molibdato de amônio. A fitase produzida foi fortemente ativada na presença de Mn, K, Mg, Ca, Fe, Cu, Zn e Ni. Além disso, o acetato, citrato, Co e Na apresentaram leve

ativação da enzima. Por outro lado, o molibdato de amônio inibiu completamente a enzima produzida.

TABELA 15. Influência dos íons metálicos na atividade da fitase.

Íon (1mM)	Atividade Relativa da fitase (%)
Controle	100
MnSO ₄	369,7
K ₂ SO ₄	356,5
CaSO ₄	342,9
MgSO ₄	315,9
Fe ₂ (SO ₄) ₃	308,4
Na ₂ SO ₄	294,8
FeSO ₄	293,1
NiSO ₄	285,4
CuSO ₄	274,4
ZnSO ₄	211,6
Acetato de sódio	135,8
Citrato de sódio	120,8
CoSO ₄	120,4
NaCl	102,8
Molibdato de amônio	0

Comparando estes resultados com os encontrados na literatura, verificou-se que uma outra fitase produzida por *A. niger* também foi ativada por MnSO₄ 200 mM (CASEY e WALSH, 2003). Outra fitase de *A. niger* foi inibida por Cu²⁺, Zn²⁺, Hg²⁺, Sn²⁺, Cd²⁺, e fortemente inibida pelo F⁻, porém foi ativado por Ca²⁺, Mg²⁺ and Mn²⁺ (DVORÁKOVÀ, 1997), que está de acordo com os resultados da fitase de *S. commune* deste estudo. A ração para animais monogástricos tipicamente contém minerais na sua formulação, e a ativação destes íons sobre a atividade de fitase pode ser benéfica (CASEY e WALSH, 2004).

4.8.6 Influência da concentração de fosfato inorgânico na atividade da fitase

Diferentes concentrações de fosfato inorgânico foram testadas durante a reação enzimática e a atividade da fitase de *S. commune* foi reportada (FIGURA 17). Um experimento controle (sem adição de fosfato) apresentou menor atividade da fitase (20%) em relação às atividades com 1 mM de fosfato inorgânico, que induziu a atividade da enzima. Já à 1,5 e 2 mM de fosfato inorgânico houve uma mínima indução quando comparado ao resultado da atividade sem a presença de fosfato (controle). Por outro lado acima de 2 mM

houve repressão da atividade da fitase evidenciada por uma redução (acima de 29%).

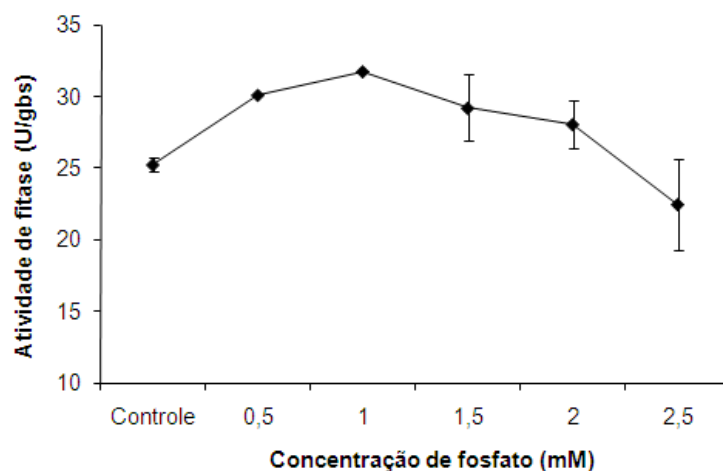


FIGURA 17. Influência da concentração de fosfato inorgânico na atividade de fitase.

Concentrações de fosfato inorgânico superiores a 5 µg/mL são capazes de inibir a síntese de fitase em muitos fungos (VATS e BANERJEE, 2002; QUAN et al., 2001). Por outro lado, baixas concentrações de fosfato inorgânico podem induzir a síntese de fitase, como é o caso da fitase de *A. niger* FS3 (SPIER et al., 2010). Já a fitase da levedura *Cryptococcus laurentii* foi completamente inibida com 0,5 mM de fosfato inorgânico (VAN STADEN et al., 2007). Dvoràkovà et al. (1997) relataram que a fitase de *A. niger* apresentou uma inibição de fosfato inorgânico a 2,85 mM/L, uma inibição não-competitiva. Uma fitase de origem vegetal, isolada de ervilha apresentou inibição em concentrações de 1 mM de fosfato inorgânico (BEAL e MEHTA, 2006). A inibição da enzima fitase no intestino de ratos foi evidenciada com 0,93 mM de fosfato inorgânico (YANG e KIM, 1994).

4.8.7 Determinação da especificidade ao substrato, determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima (V_{\max}) da reação enzimática

Para determinar a seletividade da fitase pelo substrato e os valores de K_m e V_{\max} , várias concentrações de fitato de sódio (Sigma) foram utilizadas (FIGURA 19). O K_m indica a afinidade da enzima pelo substrato. O substrato com valor menor de K_m tem uma afinidade aparente maior com a enzima. O fitato de sódio foi o substrato utilizado para o estudo de especificidade, mostrando uma velocidade de reação de 2,087 mmol de fósforo inorgânico liberado por mL.min na concentração de 1,2 mM Na-fitato (FIGURA 18). Esta velocidade de reação foi menor do que o valor encontrado por uma fitase de *A. niger*, equivalente a 3,077 mmol de fósforo inorgânico liberado por mL.min (SPIER et al., 2010).

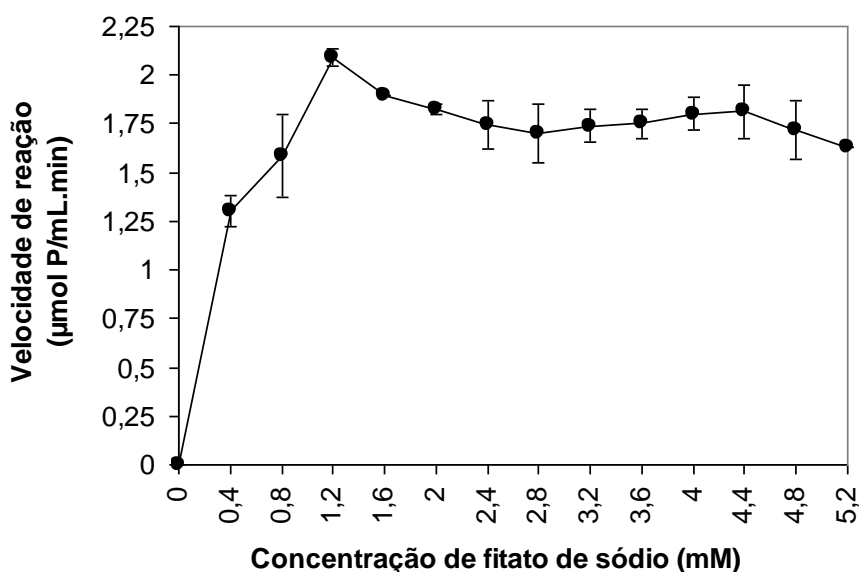


FIGURA 18 .Efeito da concentração de fitato de sódio na atividade da fitase

A FIGURA 19 mostra a velocidade de reação e a linearização pelo método de Lineweaver-Burk, o qual determina os valores de V_{\max} e K_m . A fitase de *S. commune* apresentou um valor de K_m de 0,16 mM e V_{\max} =1.85 µmol/ml.min utilizando o método de linearização, mostrando que o fitato de sódio pode ser o substrato desta enzima.

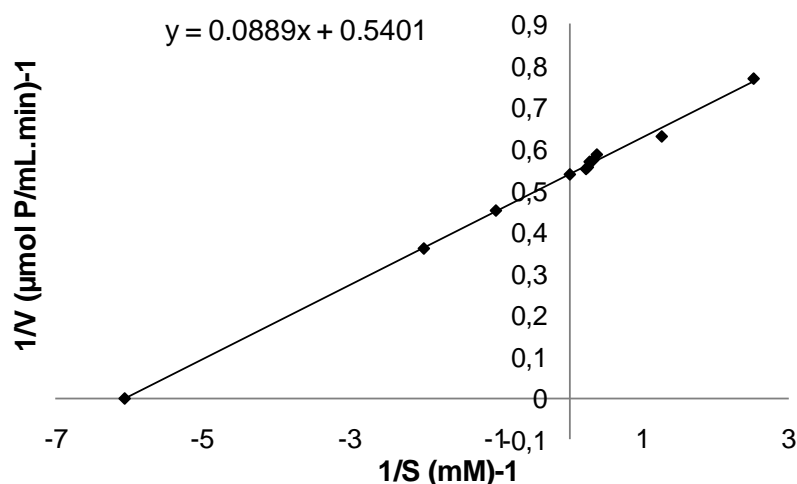


FIGURA 19. Gráfico de Linearização por Lineweaver Burk para a determinação das constantes K_m e V_{max}

Algumas constantes de Michaelis-Menten encontradas na literatura para fitases fúngicas são *A. niger* com $K_m = 0,010-0,040$ mM (KONIETZNY e GREINER, 2002) e de *Candida krusei* foi de 0,03 mM (QUAN et al., 2001). Já a fitase de *A. niger* apresentou valor maior de $K_m = 0,44$ mM em relação ao valor encontrado neste trabalho (DVORÁKOVÁ et al., 1997), sugerindo que a fitase produzida por *S. commune* apresenta uma maior afinidade pelo substrato fitato de sódio do que as fitases de *A. niger* de Dvoráková et al (1997), de *Pantoea agglomerans* $K_m = 0,34$ mM (GREINER, 2004) e do centeio K_m 0,30 mM (GREINER et al., 1997).

4.8.8 Efeito da concentração de NaCl

Neste estudo o objetivo foi avaliar a influência de diferentes concentrações de NaCl (0, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 10%) na estabilidade da fitase durante 48 horas a 4°C (FIGURA 20). A enzima fitase perdeu menos atividade na concentração de 2% de NaCl, a qual perdeu somente 4,8% da atividade durante 48 horas de armazenamento. Observou-se que à medida que a concentração de cloreto de sódio aumenta no extrato bruto, ocorre uma maior perda da atividade. Ullah et al (2008) reportaram que 500 mM de NaCl teve um efeito significativo na atividade da fitase de *A. niger*.

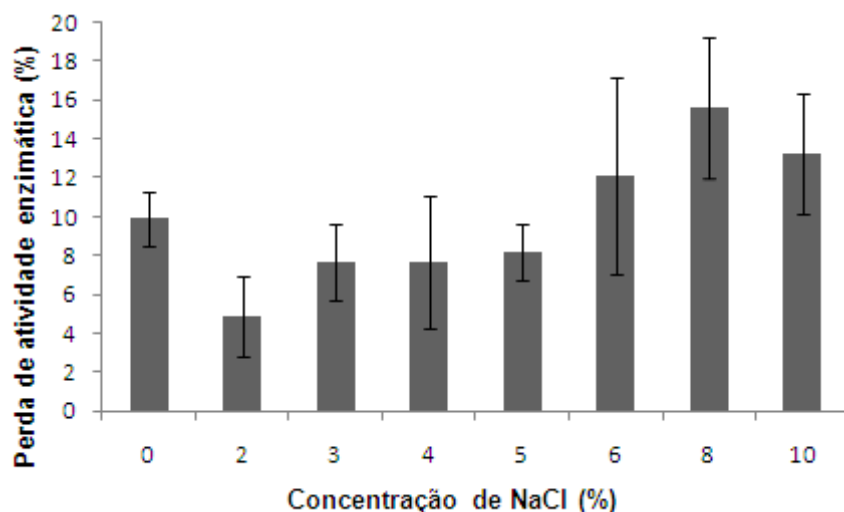


FIGURA 20. Efeito da concentração de NaCl na estabilidade da fitase

4.8.9 Estudo da estabilidade da fitase em diferentes condições de armazenamento

A FIGURA 21 mostra a estabilidade da atividade fitase de *S. commune* durante o armazenamento à temperatura ambiente ($26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), sob refrigeração (4°C) e congelamento (-18°C). A fitase apresentou uma grande estabilidade durante o armazenamento em temperatura ambiente e refrigeração, perdendo somente 10% de sua atividade em 42 dias (FIGURA 21). Após 100 dias, a fitase armazenada sob refrigeração, manteve 40% de sua atividade inicial. À temperatura ambiente, a fitase manteve praticamente 12% de atividade após 100 dias de armazenamento. Após 140 dias de armazenamento sob resfrigeração, a fitase apresentou 20% de sua atividade inicial, enquanto o extrato enzimático armazenado em temperatura ambiente perdeu sua atividade total após 126 dias. A fitase armazenada a -18°C (temperatura de congelamento) apresentou 41% de atividade relativa em 98 dias de armazenamento.

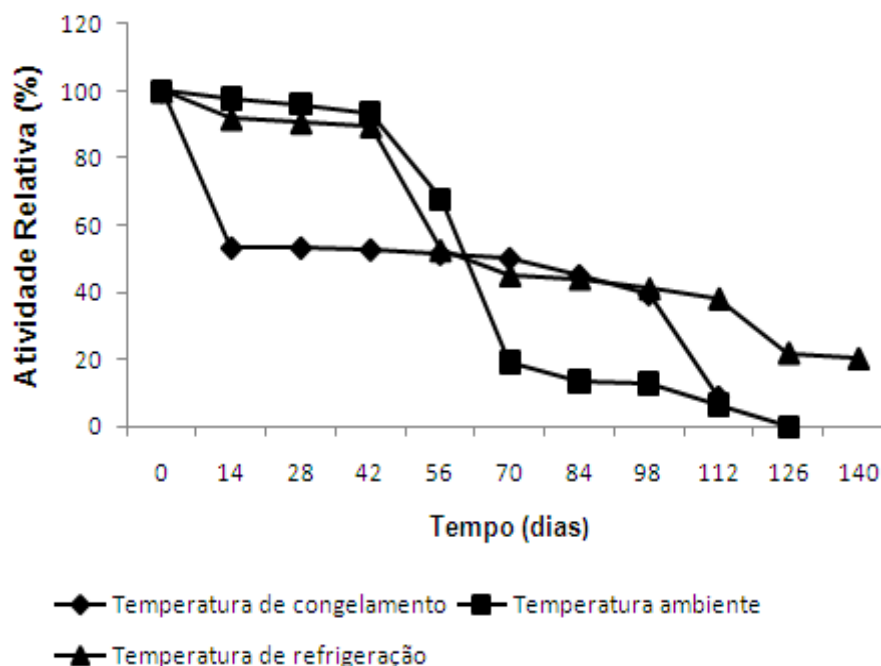


FIGURA 21. Estudo da estabilidade da fitase à temperatura ambiente, refrigeração e congelamento durante 140 dias.

Nair e colaboradores (2006) estudaram a estabilidade da fitase de *Aspergillus ficuum* em armazenamento a 4°C. A enzima perdeu apenas 15% da sua atividade em cinco semanas. Outra fitase de *A. fumigatus* reteve 96% da atividade inicial após 12 semanas em temperatura ambiente (BRUGGER et al., 2004). O produto enzimático comercial Natuphos® 5000 contendo fitase de *Aspergillus niger*, é estável em meio aquoso (100% estável por 6 horas à temperatura ambiente). O produto é estável durante 12 meses a 4°C. A perda da atividade da fitase após o armazenamento por 6 meses a 21°C foi baixa (HEALTH e CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL, 2010). A atividade de fitase de *Pseudomonas sp.* armazenada em temperatura ambiente, manteve superior a 90% de atividade durante 3 dias. Após o 5º dia, a atividade enzimática manteve 85%. Após 10 dias de armazenamento, a atividade da fitase foi ainda superior a 80%. Em temperatura de refrigeração, a atividade enzimática remanescente foi superior a 90% após 12 semanas de armazenamento (SRI-AKKHARIN, 2004). De acordo Fu et al (2008) fitase de *Yersinia kristeensenii* reteve quase toda sua atividade em armazenamento a 4°C por 8 meses.

4.8.10 Estudo da estabilidade da fitase com adição de estabilizantes no extrato bruto

O presente estudo teve como objetivo de analisar a estabilidade da fitase utilizando estabilizantes químicos no extrato bruto do *S. commune* por 130 dias em temperatura ambiente. Estudaram-se estabilizantes em três concentrações diferentes, denominadas máxima, média e mínima (TABELA 16). Todas as formulações tiveram resultados excelentes, porém os estabilizantes na concentração mínima apresentaram um melhor resultado. Possivelmente alguns estabilizantes foram capazes de exercer a função de ativação da enzima fitase ou proporcionar melhor conformação da enzima (talvez até durante a reação enzimática realizada para a determinação da atividade residual), pois alguns resultados de atividade foram superiores às atividades do controle (sem aditivos). A maior atividade da fitase (109% do extrato bruto inicial de atividade) foi obtida na presença do aditivo A na concentração mínima de 0,25% (p/v) (FIGURA 24). Estes são eficazes na estabilidade de enzimas, pois estas se tornam mais rígidas dificultando a desnaturação da estrutura da enzima em soluções aquosas (COSTA et al., 2002; MICHIAKI e KAZUO, 1997; LONGO e COMBES, 1999). Os aditivos A e B são capazes de estabilizar as proteínas pelos efeitos na superfície da enzima, ocorrendo um impedimento estérico de interações proteína-proteína e aumento da viscosidade das soluções (WANG, 1999). Os estabilizantes C e F, também apresentaram bons efeitos na atividade da fitase, mantendo-as durante o armazenamento. Aditivos F aumentam a estabilidade da proteína, através do reforço de interações hidrofóbicas entre os resíduos não-polares de aminoácidos, portanto, levando ao enrijecimento da proteína (IYER e ANANTHANARAYAN, 2008). O extrato enzimático armazenado com o aditivo E manteve 83% de sua atividade inicial após 47 dias de armazenamento. No entanto, a contaminação microbiana foi observada no 57º dia e os ensaios com este estabilizante na concentração mínima foram interrompidos.

TABELA 16. Influência dos estabilizantes em concentrações máxima, média e mínima na atividade da fitase.

Estabilizantes	Atividade Relativa (%)		
	90 dias de armazenamento à 25±2 °C		
	Concentração máxima	Concentração média	Concentração mínima
A	94	78	109
B	57	74	75
C	0	88	90
D	65	82	74
I	60	70	78
E	20	0	0
F	54	90	80
G	24	59	76
H	0	75	76
Controle	41	50	75

* Os aditivos estão protegidos por patente.

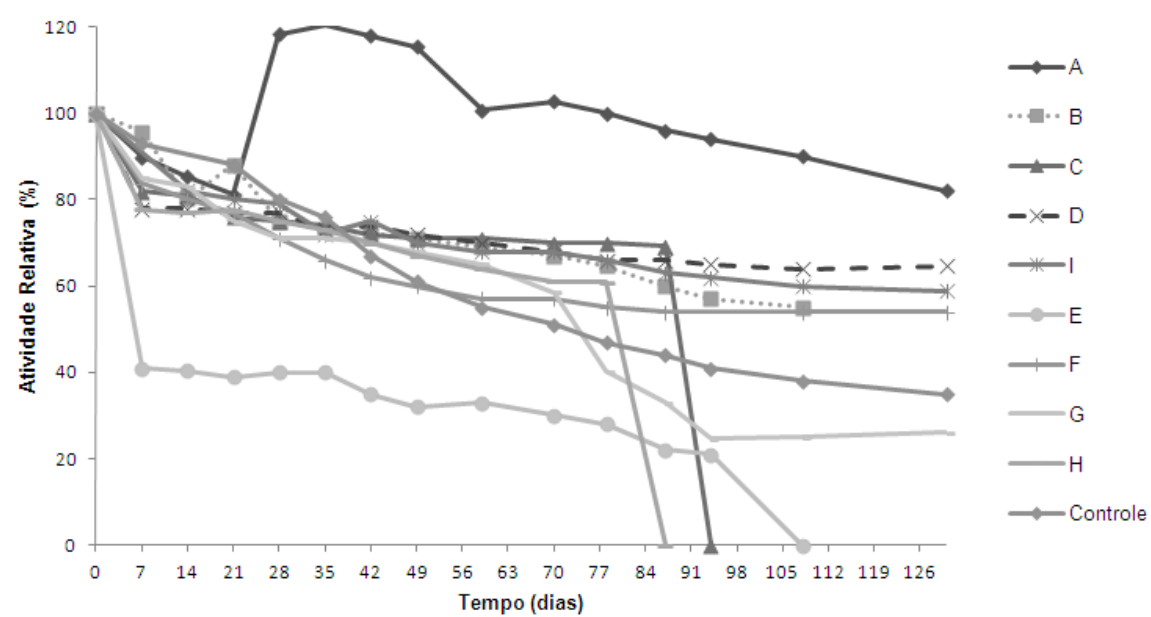


FIGURA 22. Influência da adição de aditivos (concentração máxima) na atividade da fitase em 130 dias de armazenamento em temperatura ambiente.

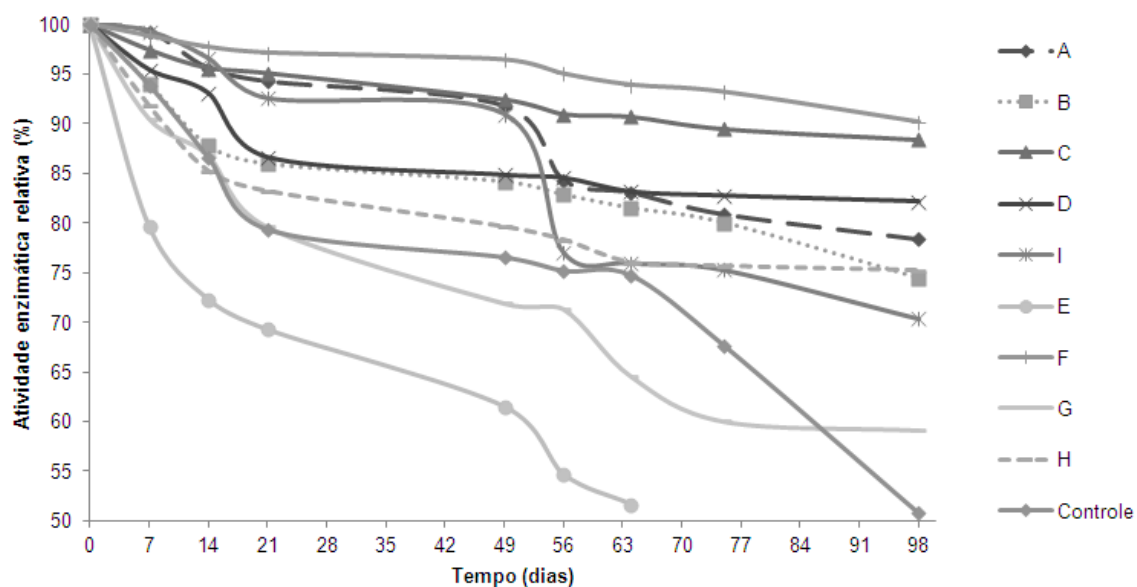


FIGURA 23. Influência da adição de aditivos (concentração de média) na atividade da fitase em 98 dias de armazenamento em temperatura ambiente.

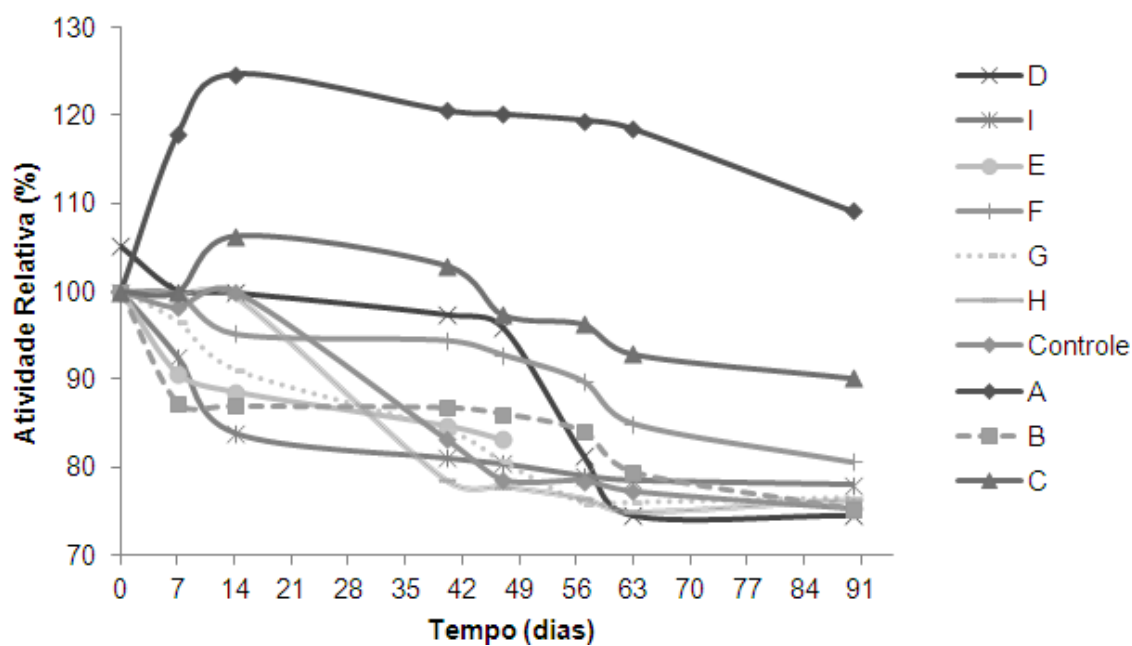


FIGURA 24. Influência da adição de aditivos (concentração mínima) na atividade da fitase em 90 dias de armazenamento em temperatura ambiente.

4.9 Cinética de produção de fitase por *S. commune*

O estudo da cinética de produção de fitase foi realizado em escala laboratorial em frascos Erlenmeyer. As fermentações em estado sólido foram realizadas conforme os parâmetros do processo otimizados estudados anteriormente: 5% (p/v) de sacarose, temperatura de crescimento 33°C, pH 7 e taxa de inóculo 7,5%. Os frascos foram incubados por 128 horas a 33°C e a cada 6 horas foram retiradas amostras de fermentado. A produção de fitase foi avaliada por meio da determinação de atividade enzimática, consumo de açúcares, pH, e determinação da biomassa pelo método indireto de quantificação de ergosterol. A FIGURA 28 reapresenta os resultados do estudo da cinética de produção de fitase por *S. commune*. A atividade máxima de fitase (96 U/gbs) foi alcançada em 66 horas de fermentação. A produção de biomassa atingiu 11,69 g de biomassa / 100 g de amostra fermentada em base úmida em 128 horas de fermentação após este período a biomassa ainda estava aumentando. A fase lag ou fase de adaptação dura em torno de 12 horas e a partir deste momento a biomassa começa a aumentar, caracterizando assim o início da fase log ou fase de crescimento logarítmico, que continua durante o processo de fermentação. O acompanhamento do crescimento da biomassa deveria continuar após 128 horas para definição da fase estacionária e a de declínio (não avaliadas). A maior produtividade (1,466 U/gbs/h) foi alcançada após 66 horas de fermentação. Spier et al (2009) estudaram a cinética de produção de fitase por *A. niger* FFS3 em fermentação em estado sólido utilizando polpa cítrica com substrato/suporte, a qual obteve 96 U/gbs de fitase em 96 horas de fermentação. Bogar e colaboradores (2003) produziram 25 U/gbs de fitase por *A. ficuum* utilizando farelo de trigo como substrato/suporte em 96 horas de fermentação. O pH manteve-se entre 5,25 a 6,48 durante as 128 horas de fermentação.

O consumo de açúcares ao longo do tempo da fermentação relaciona-se com o crescimento da biomassa fúngica (FIGURA 25), o crescimento microbiano ocorre concomitantemente com a degradação do substrato, farelo de trigo. Esta degradação gera um decréscimo na concentração de açúcares totais e, conseqüentemente, aumento da biomassa fúngica ao longo do tempo

de fermentação. Os açúcares foram consumidos durante todo o processo de fermentação em 128 horas. Spier et al (2009) estudaram a síntese de fitase em FES de *A. niger* FS3 e houve uma redução de 25% dos açúcares totais durante a FES. *P. anomala* cultivada em meio de cultivo otimizado contendo melaço de cana em um fermentador de 5 litros. Neste caso ocorreu um consumo de açúcares totais de 100% durante a produção de fitase em 30 horas de fermentação (KAUR e SATYANARAYANA, 2005). A produção de fitase por *Sporotrichum thermophile* em um fermentador contendo meio otimizado com melaço de cana resultou em 90% do consumo de açúcares totais durante todo o processo (SINGH e SATYANARAYANA, 2008).

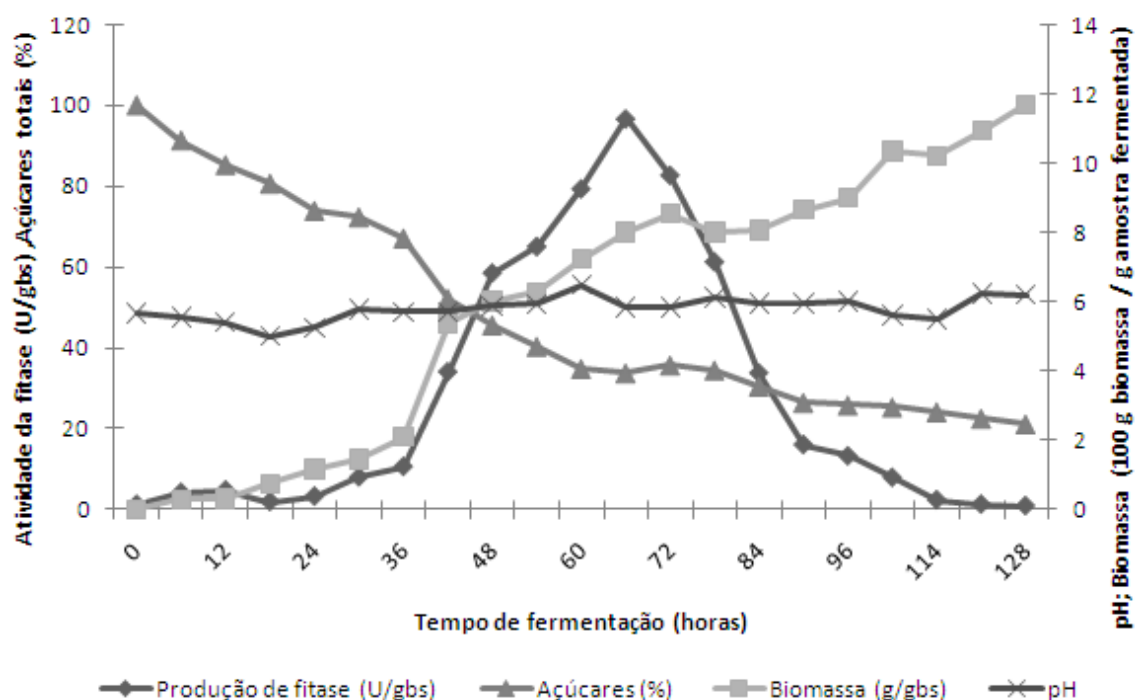


FIGURA 25. Cinética de produção de fitase e evolução dos parâmetros do processo (açúcares totais, biomassa, pH e atividade de fitase) por *S. commune* utilizando farelo de trigo pré-tratado.

4.10 Recuperação da fitase

4.10.1 Extração líquido-líquido da fitase

Um planejamento fatorial 2^4 com quatro repetições no ponto central foi utilizado para analisar quais as variáveis (concentração de citrato, massa molar

do PEG, concentração de PEG e pH) que influenciaram a extração líquido-líquido da fitase, e as interações entre as variáveis sobre as variáveis-resposta (coeficiente de partição, recuperação e aumento de pureza da enzima). Foi escolhido o sal citrato de sódio para realizar este experimento, pois este não interfere na atividade da enzima fitase. A TABELA 17 apresenta os resultados obtidos com o planejamento fatorial. As análises estatísticas foram calculadas com o auxílio do programa Statistica 8.0. (Statsoft Inc, 2008).

TABELA 17. Resultados do planejamento fatorial completo (2^4) da extração da fitase na fase superior (PEG) do sistema PEG/Citrato.

Ensaio	CIT ^a (% m/m)	MPEG ^b (g/mol)	CPEG ^c (% m/m)	pH	K ^d	Y ^e	AP ^f
1	14	1500	18	5	1,013	319,59	3,358
2	18	1500	18	5	1,827	157,82	3,331
3	14	10000	18	5	1,034	50,82	0,722
4	18	10000	18	5	1,739	30,18	0,561
5	14	1500	22	5	1,471	176,91	3,195
6	18	1500	22	5	1,645	178,76	2,541
7	14	10000	22	5	1,656	75,49	1,163
8	18	10000	22	5	2,633	60,34	1,084
9	14	1500	18	7	1,395	189,97	2,679
10	18	1500	18	7	2,068	188,39	2,874
11	14	10000	18	7	1,646	118,30	2,018
12	18	10000	18	7	2,223	80,48	1,726
13	14	1500	22	7	1,644	367,15	5,433
14	18	1500	22	7	2,510	251,72	4,071
15	14	10000	22	7	1,534	187,34	3,018
16	18	10000	22	7	2,097	155,09	2,415
17 (C) ^g	16	6000	20	6	1,995	79,59	1,437
18 (C) ^g	16	6000	20	6	1,666	72,30	1,406
19 (C) ^g	16	6000	20	6	2,156	75,02	1,323
20 (C) ^g	16	6000	20	6	1,936	73,45	1,405

- (a) CIT: concentração de citrato (% m/m)
- (b) MPEG: Massa molecular de PEG (g/mol)
- (c) CPEG: concentração de PEG (% m/m)
- (d) K: coeficiente de partição
- (e) Y: rendimento (%)
- (f) AP: aumento de pureza
- (g) C: Ponto central

Na FIGURA 26 pode-se observar o gráfico de Pareto, onde o maior efeito significativo foi o da concentração de citrato para o coeficiente de partição (k). Há um aumento no coeficiente de partição (k) com o uso de citrato 18% (m/m) na extração líquido-líquido da fitase. Nesta condição com citrato 18% (m/m), PEG 10000, 22% de PEG e pH 5 obteve-se o maior valor de coeficiente de partição (2,63).

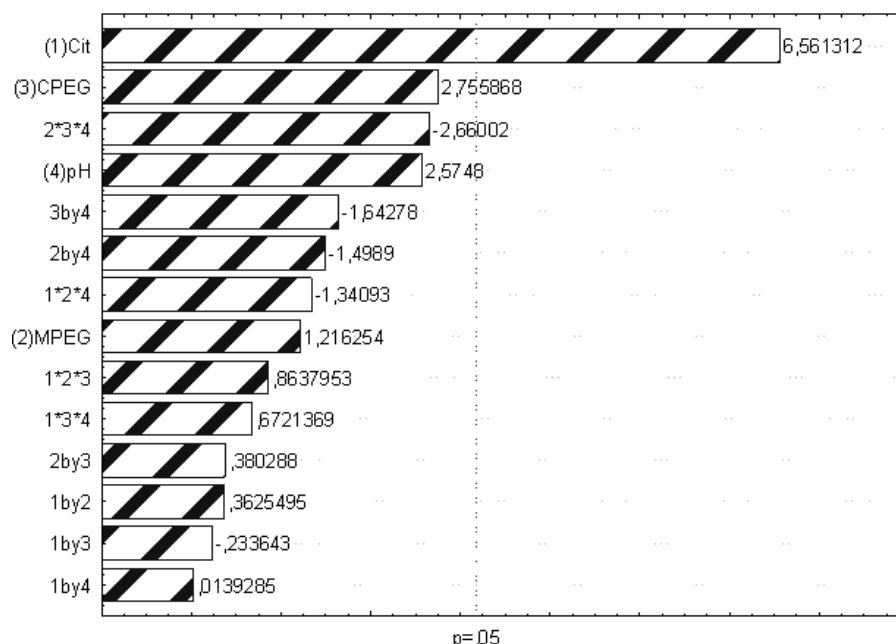


FIGURA 26. Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta o coeficiente de partição (k) da fitase. (1) Concentração de Citrato; (2) Massa molar do PEG; (3) Concentração do PEG; (4) pH.

Este fenômeno pode ser explicado pela teoria de *salting-out*, pois quando a concentração salina aumenta na fase inferior, as proteínas são forçadas a particionar para fase superior (HEY et al., 2005.; TRINDADE et al., 2005.; ZAFARANI-MOATTAR et al, 2005). A enzima protease de *Bacillus cereus*, com característica alcalina, apresentou um coeficiente de partição de 2,26 em um sistema com PEG 6000 e fosfato de potássio (RAI, 2010). Outra

protease ácida produzida por fermentação submersa de *Penicillium roqueforti* apresentou resultado semelhante de coeficiente de partição 2,6, usando um sistema com PEG 4000 e 15% e fosfato de sódio (PERIČIN et al., 2008). A extração líquido-líquido da enzima fitase de *Trichosporon* spp. mostrou um coeficiente de partição de 2,69 na fase superior do sistema devido a sua maior afinidade com o as propriedades hidrofóbicas do PEG, em um sistema utilizando PEG 8000 pH 8 e fosfato de potássio (SANTOS et al., 2007). O resultado do coeficiente de partição foi de 2,11 para a extração em SDFA para pectinase de *Penicillium cyclopium* com sistema PEG 1500 e concentração de 15% e 5% de dextrana na fase inferior (PRODANOVIĆ e ANTOV, 2008).

Na FIGURA 27 observa-se que o efeito mais significativo para a recuperação da fitase observado foi novamente a concentração de citrato, porém com efeito negativo, demonstrando que quanto menor é a concentração de citrato maior é a recuperação da fitase. Outras variáveis significativas também foram observadas e com efeitos negativos como o pH e a massa molar do PEG.

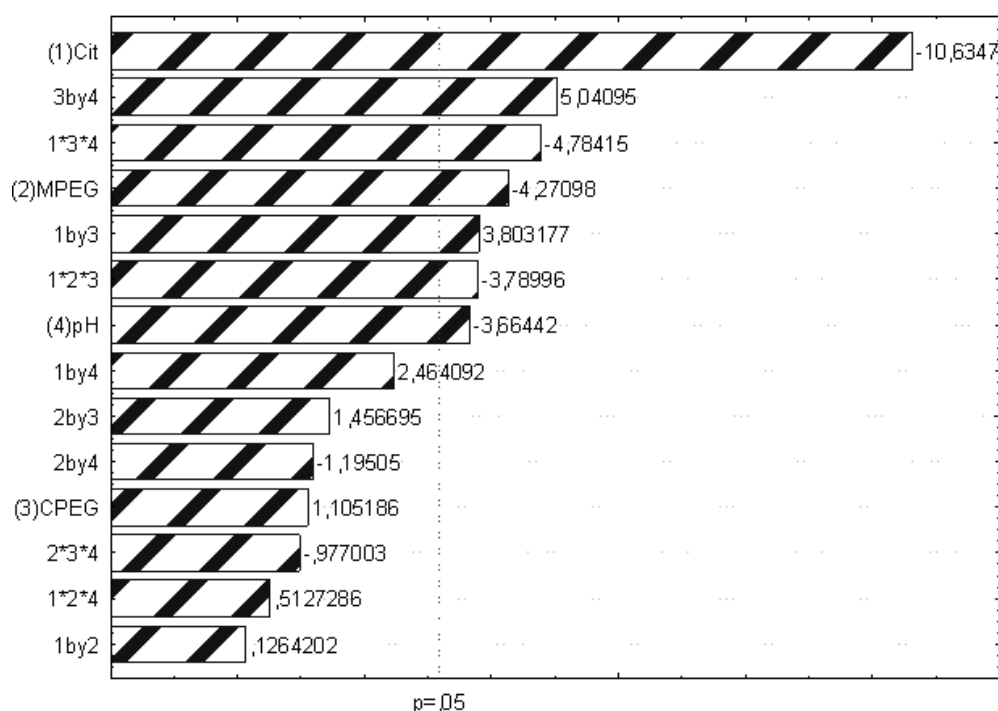


FIGURA 27. Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta da recuperação da fitase (Y). Os significados dos símbolos são: (1)

concentração de Citrato; (2) Massa molar do PEG; (3) Concentração do PEG; (4) pH.

A FIGURA 28 apresenta o gráfico geométrico, que representa a interação significativa entre três variáveis, com relação à recuperação da fitase. A melhor condição para a recuperação da fitase foi obtida com citrato 14% (m/m), massa molar de PEG 1500, concentração do PEG 22% (m/m) e pH 7. O melhor resultado da recuperação da enzima utilizando o SDFA foi de 367%. Rendimentos maiores que 100 % em SDFA são comuns em estudos com enzimas. Porto et al (2008) estudaram a extração líquido-líquido da protease ácida de *C. perfringens*, a qual obteve um rendimento de 131% usando PEG 10000, concentração de PEG 22% e concentração de citrato 8.0% e pH 8.5. A purificação da enzima β -xylosidase de *Trichoderma koningii* propiciou um alto rendimento de 422%, onde foi utilizado PEG 1500 com concentração de 25%, fosfato de sódio 25% e pH 4,4 (PAN et al., 2001).

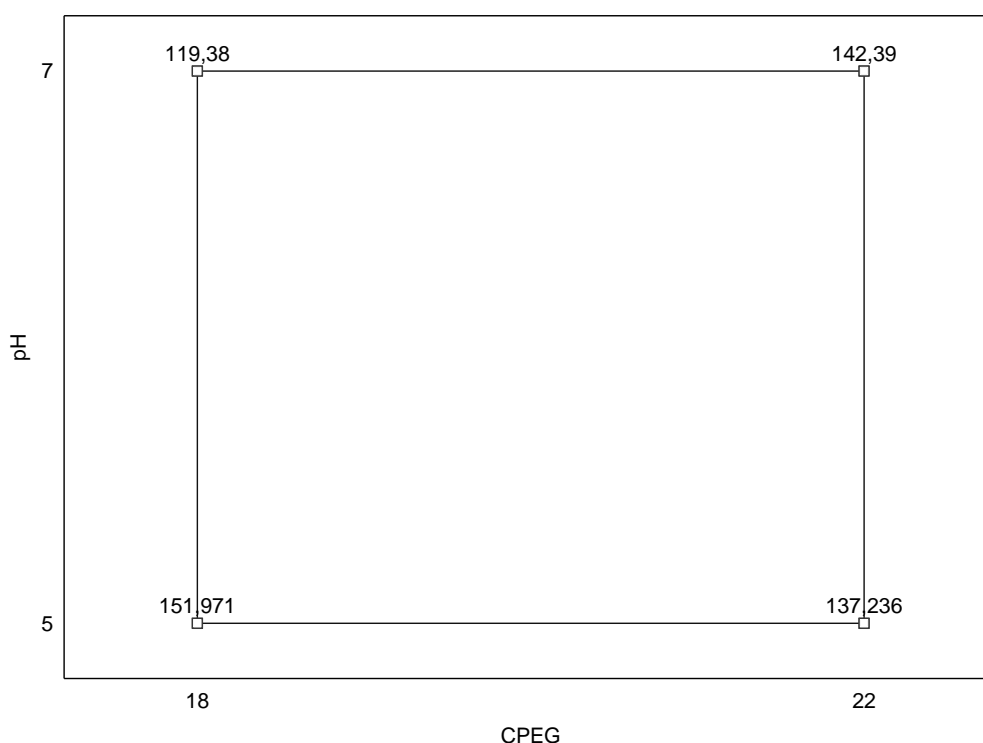


FIGURA 28. Diagrama de interpretação geométrica dos efeitos, tendo como variável resposta a recuperação (Y) da fitase para analisar o pH em função concentração de PEG durante a SDFA.

As variáveis que apresentaram efeitos significativos para o fator de purificação foram a massa molar do PEG com efeito negativo e o pH com efeito positivo (FIGURA 29). O efeito negativo significa que quanto menor a massa molar do PEG maior é o fator de purificação. O maior valor encontrado para o fator de purificação foi 5,43. Os experimentos que utilizaram PEG 1500 apresentaram os melhores resultados para o fator de purificação se comparados com PEG 10000. Estudos de extração líquido-líquido demonstraram um fator de purificação acima de 5 (PERIČIN et al., 2009). Resultados similares foram obtidos para purificação por SDFA α -toxina de *C. perfringens* com fator de purificação 4,2 usando PEG 10,000 g/mol e citrato 12% e pH 8.0 (PORTO et al., 2008) e 4,6 o valor do fator de purificação da mesma toxina de *C. perfringens* para o sistema de PEG 8000 (15%,p/p), fosfato 20% (p/p) e pH 8.0 (CAVALCANTI et al., 2006.)

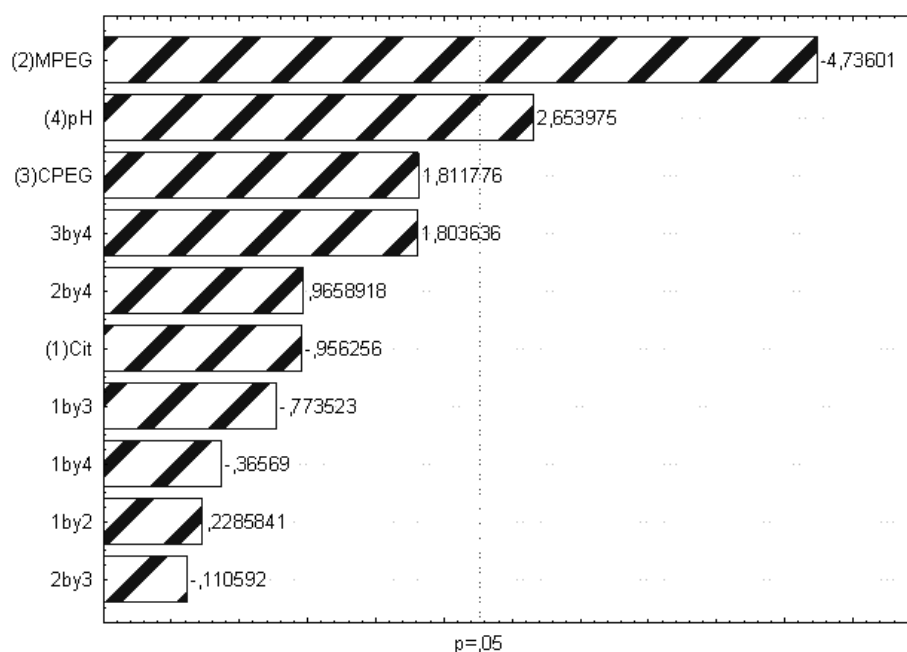


FIGURA 29. Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta o fator de purificação da fitase (AP). Os significados dos símbolos são: (1) concentração de Citrato; (2) Massa molar do PEG; (3) Concentração do PEG; (4) pH.

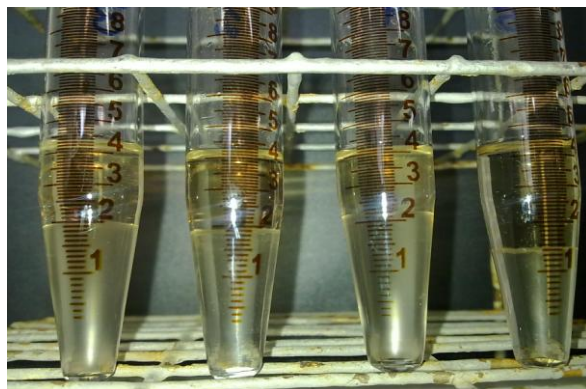


FIGURA 30. Sistema de duas fases aquosas PEG/Citrato para extração da fitase de *S. commune* em tubos graduados.

4.10.2 Cromatografia de troca iônica

O extrato bruto enzimático produzido por *S. commune* em FES foi submetido à cromatografia de troca iônica. O perfil de eluição da cromatografia aniônica DEAE-Sepharose apresentou um pico protéico com atividade de fitase de 4 U/mL. Os resultados de atividade de fitase, D.O. 280 nm e o gradiente de NaCl estão demonstrados na FIGURA 31. As frações (10 a 13) que apresentaram maior atividade de fitase foram reunidas e dialisadas. Nesta etapa a enzima obteve um rendimento de 18,8% (TABELA 18).

A mistura das frações 10 a 13 foram submetidas a cromatografia catiônica *SP-Sepharose* que apresentou um pico protéico na densidade óptica nas frações 7 e 8, porém não resultou em um pico de atividade de fitase (FIGURA 32). O rendimento da enzima resultou em 2,7% (TABELA 18).

A técnica de cromatografia de troca iônica não foi eficiente para a recuperação da enzima, pois apresentou rendimentos baixos de fitase de *S. commune* (TABELA 18).

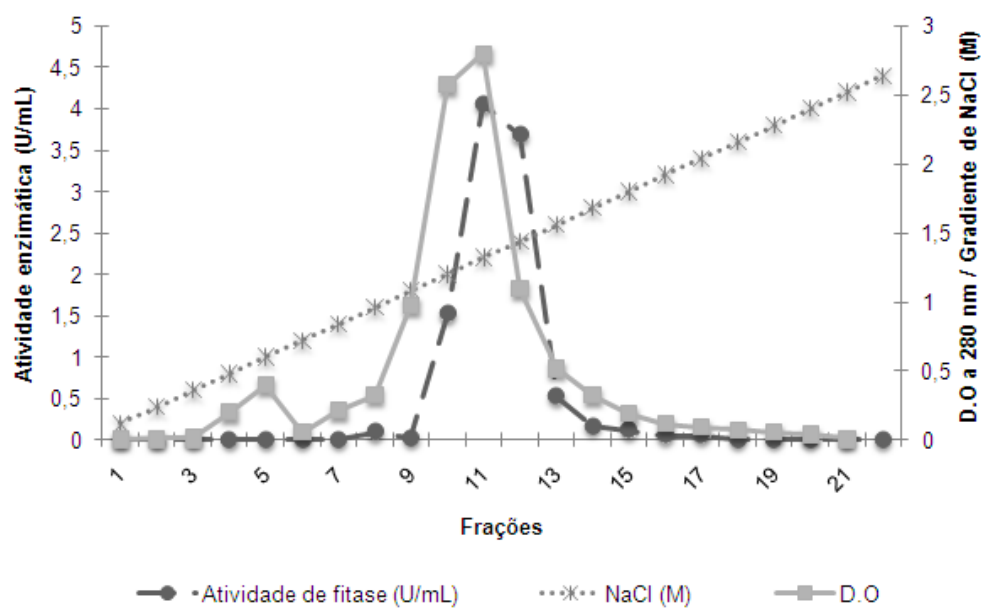


FIGURA 31. Perfil cromatográfico de eluição da fitase de *S. commune* em resina aniônica *DEAE-Sepharose*.

TABELA 18. Resultados da recuperação da fitase por *S. commune*

Etapas da recuperação	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (100%)
Extrato bruto	66	622	9,4	100
DEAE-Sepharose	6	117	20	19
SP-Sepharose	0,6	16,8	26	2,7

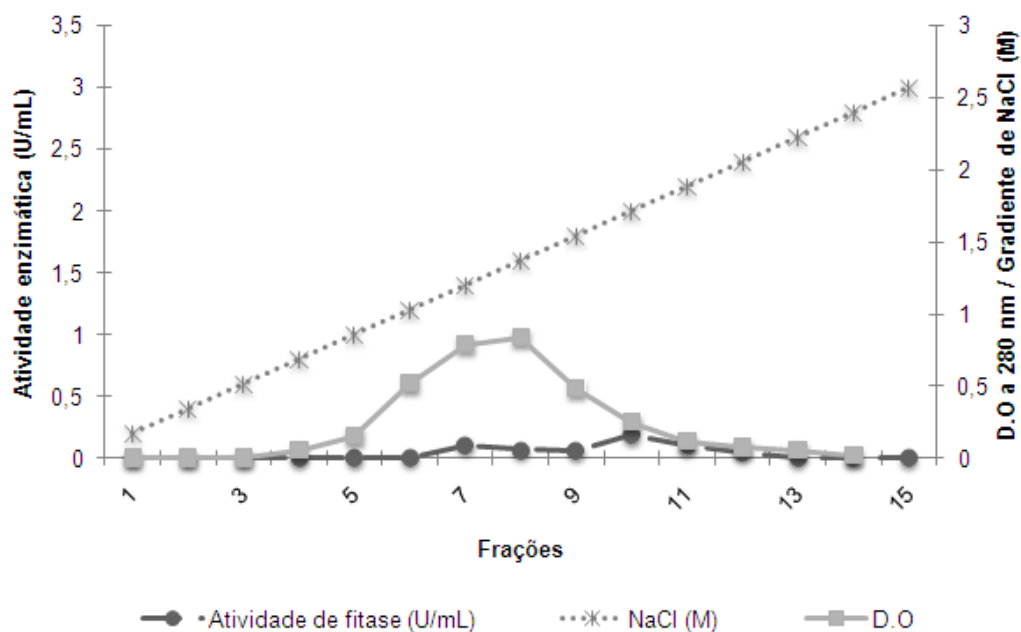


FIGURA 32. Cromatografia de troca catiônica em resina SP-sepharose com eluição da fitase de *S. commune*.

4.10.3 Ultrafiltração

A técnica de ultrafiltração pode ser aplicada para a concentração e separação parcial de proteínas de acordo com o seu tamanho molecular. A fração retida ≥ 30 KDa concentrou 13,3 vezes a enzima fitase, seguida da fração ≥ 50 KDa que concentrou 11,4 vezes. Pode estimar-se que a fitase de *S. commune* está entre 30 KDa e 50 KDa conforme a FIGURA 33.

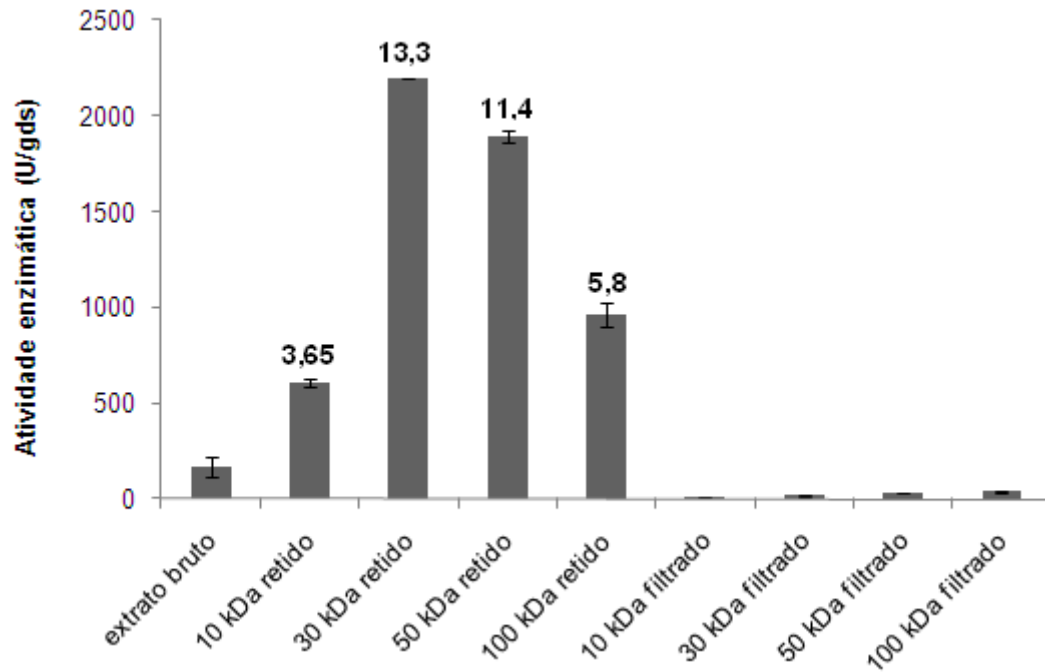


FIGURA 33. Etapa de ultrafiltração do extrato bruto da FES de *S. commune* para separação da fitase

4.10.4 Eletroforese SDS-PAGE

O gel obtido na eletroforese SDS-PAGE (FIGURA 34) apresenta as bandas protéicas obtidas do extrato bruto, entre 10 e 100 KDa, ≥ 100 KDa, ≥ 30 KDa, na etapa de ultrafiltração. O perfil protéico presente no gel possui muitas bandas e próximas uma das outras.

Verifica-se a repetição de banda protéica em todas as amostras, com maior intensidade na fração > 30 KDa. É sugestivo que a fitase produzida esteja representada pela banda protéica de tamanho aproximado de 40 KDa. Este dado confirma com dados obtidos no banco de sequências chamado *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e o programa Mascot Search para uma fitase reportada de um basidiomiceto de mesmo gênero, porém nenhum relato anteriormente havia sido publicado por *S. commune*. O sequenciamento desta banda protéica por MALDI-TOF TOF poderia confirmar esta hipótese.

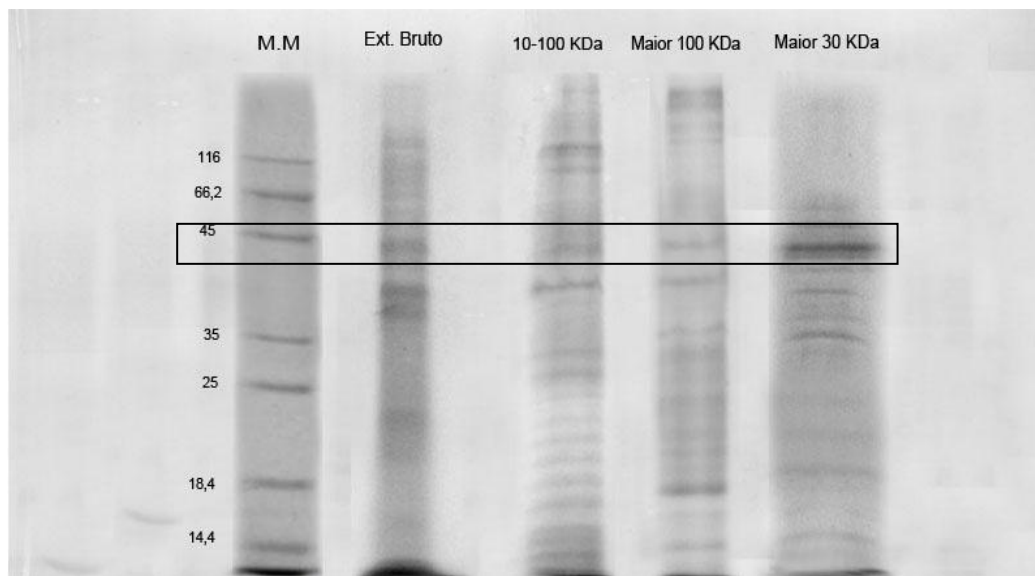


FIGURA 34. Eletroforese SDS-PAGE da fitase produzida por *S. commune*. O poço nomeado MM corresponde aos marcadores moleculares (Fermentas) utilizados: 116,0; 66,2; 45,0; 35,0; 25,0; 18,4; e 14,4 kDa

5. CONCLUSÕES

- O macromiceto *Schizophyllum commune* foi selecionado como um bom produtor de fitase, pois apresenta fácil manuseio, crescimento rápido no meio de inóculo e no processo de fermentação no estado sólido;
- O farelo de trigo foi selecionado como substrato/suporte, o qual apresentou a maior produção de fitase por FES PELO *S. commune*;
- Os melhores pré-tratamentos possuem uma influência positiva na produção de fitase;
- A otimização dos parâmetros da FES para produção de fitase utilizando *S. commune* foram: umidade 50%, concentração de sacarose 5%, temperatura de fermentação 33°C, pH 7 e taxa de inóculo 7,5%;
- Durante a cinética final, a maior produção ocorreu em um período de 66 horas de fermentação com produtividade de 1,466 U/gbs/h;
- A fitase de *S. commune* possui um pH ótimo de 5,0, temperatura ótima de 50°C e valores de K_m e V_{max} de 0.16mM and 1.85 $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ respectivamente.
- A fitase foi ativada na presença dos íons K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Na^+ , acetato e citrato. A atividade enzimática foi inibida totalmente na presença de 1 mM de molibdato de amônio.
- A melhor condição de armazenamento da fitase foi a 4°C com 38% da atividade inicial em 112 dias, e em 125 dias de armazenamento ainda apresenta atividade enzimática.
- Estudos com adição de estabilizantes no extrato bruto obtiveram excelentes resultados. O PEG 3350 foi o melhor agente estabilizante, com 109% da atividade de fitase em 90 dias de armazenamento;

- O estudo da extração líquido-líquido foi satisfatório. Os parâmetros otimizados da extração líquido-líquido foram citrato 14% (m/m), massa molar de PEG 1500, concentração do PEG 22% (m/m) e pH 7
- A fitase de *S. commune* foi estimada entre 30 KDa e 50 KDa.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar o estudo do escalonamento do processo da produção da fitase utilizando os parâmetros otimizados; FES E SUBMERSA
- Estudar a produção de fitase por fermentação submersa em biorreatores;
- Realizar a FES em biorreatores do tipo colunas e a análise respirométrica;
- Estudar outras estratégias de purificação da enzima fitase, utilizando outras técnicas como gel filtração;
- Realizar um estudo da formulação da enzima fitase em pó;
- Estudar os efeitos da aplicação do produto formulado contendo a enzima fitase de *S. commune* nos animais alimentados com ração animal contendo a enzima;
- Utilizar técnicas de biologia molecular para a tentativa de expressão do gene da fitase de *S. commune* em outro micro-organismo para obter maiores atividades de fitase.

REFERÊNCIAS

ABIMA. **Produção e consumo de trigo.** Disponível em: http://www.abima.com.br/est_mtrigo.asp. Acessado em 05/03/2011.

ABITRIGO. **Associação brasileira a indústria do trigo.** Disponível em: <http://www.abitrigo.com.br/trigo.asp> . Acessado em 05/03/2011.

ABIOYE, S.; IGE, D.; AKINREMI, O.; NYACHOTI, M.; DON FLATEN. Characterizing Fecal and Manure Phosphorus from Pigs Fed Phytase supplemented Diets. **Journal of Agricultural Science**, v.2, p. 3 – 12, 2010.

ACUNA-ARGUELLES, M. E.; GUTIERREZ-ROJAS, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES E. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 43, p. 808–814 , 1995.

AFINAH, S; YAZID, A. M.; ANIS SHOBIRIN, M. H.; SHUHAIMI, M. Phytase: application in food industry. **International Food Research Journal** v. 17 p. 13-21, 2010.

ALEXOPOULOS, C. J., C. W. MIMS, AND M. BLACKWELL. Introductory Mycology (4th Ed.). John Wiley and Sons, New York, USA. 868p., 1996.

ALVES, J. G. L. F. ; CHUMPITAZ, L. D. A.; SILVA, L. H. M.; FRANCO, T. T. ; MEIRELLES, A. J. A. Partitioning of whey proteins, bovine serum albumin and porcine insulin in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 743, p. 235-239, 2000.

ANDERSON, J. J. B. Calcium, Phosphorus and Human Bone. **Development. American Institute of Nutrition**, 1996.

ANDRIOTIS, V. M. E.; ROSS, J. D. Isolation and characterisation of phytase from dormant *Corylus avellana* seeds. **Phytochemistry**, v. 64, p. 689–699, 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 920.39,C). Arlington: A.O.A.C., v. 33, p. 10-12, 1995.

ARORA, DAVID. **Mushrooms Demystified.** In: Polyporaceae & Allies. p. 590 – 591. 2ª edição. Ed. Tem Speed Press Berkeley, 1986.

AZEKE, M. A.; GREINER, R.; JANY, K-D. Purification and characterization of two intracellular phytases from the tempeh fungus *Rhizopus oligosporus*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 35, p. 213–227, 2011.

BARROS, L.; CALHELHA, R. C.; VAZ, J. A.; FERREIRA, I. C.; BAPTISTA, P.; ESTEVINHO, L. M. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts . **European Food Research and Technology**, v. 225, 151-156, 2007.

BEAL, L.; MEHTA, T. Zinc and phytate distribution in peas. Influence of Heat Treatment, Germination, pH, Substrate, and Phosphorus on Pea Phytate and Phytase. **J. Food Sci.**, v. 50, p. 96–100, 2006.

BERBEE, D.J., TAYLOR, J.W. **Molecular Biology and Evolution**, 9: 278-284, 1992.

BERG, L. **Introductory Botany: Plants, People and the Environment**. In: Kingdom Fungi . p. 406 – 425. 2ª edição. Ed. Thomson Books, 2008.

BHAVSAR, K.; RAVI KUMAR V.; KHIRE J. M. High level phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 in solid state culture: response surface optimization, up-scaling, and its partial characterization. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. DOI: 10.1007/s10295-010-0926-z, 2010.

BITAR, K.; REINHOLD, J.G. Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosal of rat, chicken, calf and man. **Biochimistry et Biophysics Acta**, v.268, p. 442, 1972.

BOGAR B.; SZAKACS G.; LINDEN, J.C.; PANDEY, A.; TENGERTDY, R. P. Optimization of phytase production by solid substrate fermentation. **J Ind Microbiol Biotechnol**. v.30, p.183-189, 2003.

BOLLING, S.D.; WEBEL, D.M.; MARVORMICHELIS, I.; PARSONS, C.M.; BAKER, D.H. The effect of citric acid on phytate phosphorus utilization in Young chicks and pigs. **J. Anim. Sci.**, v. 78, p. 682-689, 2000.

BOYCE, A.; WALSH, G. Purification and characterisation of an acid phosphatase with phytase activity from *Mucor hiemalis* Wehmer. **J. Biotechnol.**, v. 132, p. 82–87, 2007.

BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. **Métodos de Laboratório em Bioquímica**. Barueri, SP: Manole, 2003.

BRADFORD, M. M.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical **Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAY, M. R.; CLARKE, A. I. Identification of a glutamate residue at the active site of xylanase A from *Schizophyllum commune*. **Eur J Biochem.**, v. 219, p. 821- 827, 1994.

BRUGGER, R.; NUNES, C. S.; HUG, D.; VOGEL, K.; GUGGENBHUL, P.; MASCARELLO, F.; AUGEM, S.; WYSS, M.; VAN LOON, A. P. G. M.; PASAMONTES, L. Characteristics of fungal phytases from *Aspergillus fumigatus* and *Sartorya fumigata*. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 63 p. 383–389, 2004.

BURI, R.C.; VON REDING, W.; GAVIN, M.H. Description and characterization of wheat aleurone. **Cereal Foods World**, v. 49, p. 274–282, 2004.

CAO, L.; WANG, W.; YANG, C.; YANG, Y.; DIANA, J.; YAKUPITIYAGE, A.; LUO, Z.; LI, D. Application of microbial phytase in fish feed. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 497–507, 2007.

CASEY, A.; WALSH, G. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. **Bioresour. Technol.**, v. 86, p. 183–188, 2003.

CASEY, A.; WALSH, G. Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. **J. Biotechnol.**, v.110, p. 313–322, 2004.

CASCONE, O.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J.A. Partitioning and purification of thaumatin in aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, p. 629–635, 1991.

CAVALCANTI, M. T. H.; PORTO, T. S.; NETO, B. B. LIMA-FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F.; PESSOA JR. A. Aqueous two-phase systems extraction of α -toxin from *Clostridium perfringens* type A. **Journal of Chromatography B**, v. 833, p. 135–140, 2006.

CHANTASARTRASAMEE, K.; AYUTHAYA, D.I.; INTARAREUGSORN, S.; DHARMSTHITI S. Phytase activity from *Aspergillus oryzae* AK9 cultivated on solid state soybean meal medium. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 7, p. 2285–2289, 2005.

COLLOPY, P. D.; ROYSE, D. J. Characterization of Phytase Activity from Cultivated Edible Mushrooms and Their Production Substrates. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 25, p. 7518–7524, 2004.

COSTA, S. A.; TZANOVA, T.; CARNEIRO, A. F.; PAAR, A.; GÜBITZ, G. M.; CAVAVO-PAULO, A. Studies of stabilization of native catalase using additives. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 30, p.387–391, 2002.

COSTA, M.; LERCHUNDI, G.; VILLARROEL, F. Phytase production by *Aspergillus ficuum* in submerged and solid state fermentation using agroindustrial waste as support. **Rev. colomb. biotecnol**, v. 11, no.1, p.73–83, 2009.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to liginolytic enzyme production – review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p. 211-219, 2005.

DEBNATH, D.; PAL, A. K.; SAHU, N. P. Effect of dietary microbial phytase supplementation on growth and nutrient digestibility of *Pangasius pangasius* (Hamilton) fingerlings. **Aquacult Res**, v. 36, p.180–7, 2005.

DESCHAMPS, F.; HUET, M. C. Xylanase production in solid-state fermentation: a study of its properties. **Appl Microbiol Biotechnol** ., v. 22, p. 177–180, 1985.

DESROCHERS, M.; JURASEK, L.; PAICE, M. G. High Production of β -Glucosidase in *Schizophyllum commune*: Isolation of the Enzyme and Effect of the Culture Filtrate on Cellulose Hydrolysis. **Appl Environ Microbiol.**, v. 41, p. 222-228, 1981.

DVORÁKOVÀ, O. VOLFOVÀ, J. KOPECKÝ. Characterization of phytase produced by *Aspergillus niger*. **Folia Microbiol.**, v. 42, p. 349-52, 1997.

EECKHOUT W.; PAEPE M. Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. **Animal Feed Sci. Technol.**, v. 47, p. 19-29, 1994.

EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. **Manual teórico-prático do cultivo de cogumelos comestíveis**. Botucatu: Fundação de Pesquisa Agropecuária e Florestais, 75p.,1997.

EL-BATAL A, ABDEL I, KAREN H. Phytase production and phytic acid reduction in rapeseed meal by *Aspergillus niger* during solid state fermentation. **Food Res Int.**, v. 34, p. 715–20, 2001.

EL-ENSHASY, H.; DABA, A.; EL-DEMELLAWY, M.; IBRAHIM, A.; EL SAYED, S.; EL-BADRY, I. Bioprocess Development for Large Scale Production of Anticancer Exo-Polysaccharide by *Pleurotus ostreatus* in Submerged Culture. **Journal of Applied Sciences**, v. 10, p. 2523 - 2529, 2010.

EL-GINDY, A.A.; IBRAHIM, Z.M.; ALI U.F.; EL-MAHDY O.M. Extracellular Phytase Production by Solid-state Cultures of *Malbranchea sulfurea* and *Aspergillus Niveus* on Cost-effective Medium. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 5, p. 42-62, 2009.

ESAKKIRAJ, P.; SANDOVAL, G.; SANKARALINGAM, S.; IMMANUEL, G.; PALAVESAM, A. Preliminary optimization of solid-state phytase production by moderately halophilic *Pseudomonas* AP-MSU 2 isolated from fish intestine. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 3, p.461-468, 2010.

ESPÓSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. Caxias do Sul, Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2004.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Vitamin B1 and B2 contents in cultivated mushrooms. **Food Chemistry**, v. 106, p. 816-819, 2008.

FERREIRA, I. C.; BARROS, L.; ABREU, R. M. Antioxidants in wild mushrooms. **Curr Med Chem.**, v. 16, p. 1543-60, 2009.

FERREIRA, J. G.; BRICKER, S. B.; SIMAS, T. C. Application and sensitivity testing of a eutrophication assessment method on coastal systems in the United States and European Union. **Journal of Environmental Management**, v. 82, p. 433–445, 2007.

FU, D.; HUANG, H.; LUO, H.; WANG, Y.; YANG, P.; MENG, K.; BAI, Y.; WU, N.. YAO B, A highly pH-stable phytase from *Yersinia kristensenii*: Cloning, expression, and characterization. **Enzyme Microb. Technol**, v.42, p. 499–505, 2008.

GARG, K., SHARMA, C.B. Repeated batch production of citric acid from sugarcane molasses using recycled solid-state surface culture of *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, v. 13, p.913-6, 1991.

GARCHOW, B. G.; JOG, S. P. MEHTA, B. D.; MONOSSO, J. M.; MURTHY, P. P. N. Alkaline phytase from *Lilium longiflorum*: Purification and structural characterization. **Protein Expression and Purification** v. 46,p. 221-232, 2006.

Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune*. *Nature Biotech.*, v. 28, p. 957-63, 2010. Disponível em: <http://genome.jgi-psf.org/Schco1/Schco1.home.html>. Acessado em 21/03/2011.

Global demand for enzymes. **Journal of Surfactants and Detergents**. FindArticles.com.Disponível em: http://findarticles.com/p/articles/mi_hb5809/is_200712/ai_n32259301/

GRAMINHA, E.B.N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; SILVA, R. da, GOMES, E. Review Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, p. 1–22, 2008.

GREINER, R.; KONIETZNY, U.; JANY, K.D. Purification and properties of a phytase from rye. **J. Food Biochem**, v. 22, p. 143-161, 1997.

GREINER, R. Purification and Properties of a Phytate-degrading Enzyme from *Pantoea agglomerans*. **Protein J.**, v. 23 p. 567-576, 2004.

GREINER, R.; KONIETZNY, U. Phytase for Food Application, **Food Technol. Biotechnol.** v. 44 p. 125–140, 2006.

GREINER, R.; FAROUK, A. E. Purification and characterization of a bacterial phytase whose properties make it exceptionally useful as a feed supplement. **The Protein Journal**, v. 26, p. 577-584, 2007.

GREINER, R.; SILVA, L. G.; COURI, S. Purification and characterisation of an extracellular phytase from *Aspergillus niger* 11T53A9. **Braz. J. Microbiol.**, v. 40, p. 795-807, 2009.

GULATI, H. K.; CHADHA, B. S.; SAINI, H. S. Production of feed enzymes (phytase and plant cell wall hydrolyzing enzymes) by *Mucor indicus* MTCC 6333: Purification and characterization of phytase. **Folia Microbiologica**, v. 52, p. 491-497, 2007.

GUNASHREE, B. S.; VENKATESWARAN, G. Effect of different cultural conditions for phytase production by *Aspergillus niger* CFR 335 in submerged and solid-state fermentations. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, p. 1587-1596, 2008.

GUO, M-J.; ZHUANG, Y-P.; CHU, J.; ZHANG, S-L.; XIONG, A.S.; PENG, R.H.; YAO, Q-H. Production and purification of a novel thermostable phytase by *Pichia pastoris* FPHY34. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1660-1665, 2007.

HALTRICH, D.; SEBESTA, B.; STEINER, W. Induction of Xylanase and Cellulase in *Schizophyllum commune*. Enzymatic **Degradation of Insoluble Carbohydrates**, v. 19, p. 305–318, 1996.

HAMADA, A.; YAMAGUCHI, K-I.; OHNISHI, N.; HARADA, M.; NIKUMARU, S.; HONDA, H. High-level production of yeast (*Schwanniomyces occidentalis*) phytase in transgenic rice plants by a combination of signal sequence and codon modification of the phytase gene. **Plant Biotechnology Journal**, v. 3, p. 43–55, 2005.

HAN, Y. M.; YANG, F.; ZHOU, A. G. Supplemental phytases of microbial and cereal sources improve dietary phytate phosphorus utilization by pigs from weaning through finishing. **J Anim Sci**, v. 75, p. 1017–25, 1997.

HASAN, S.D.M. ; COSTA, J.A.V. ; SANZO, A.V.L. Heat transfer simulation of solid state fermentation in a packed-bed bioreactor. **Biotechnology Techniques**, v. 12, p. 787 - 791, 1998.

HEINONEN J. K.; LAHTI R.J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to assay of inorganic pyrophosphatase, **Analitical Biochem.**, v.113, 313-317, 1981.

Health & Consumer Protection Directorate-General. Directorate B - Scientific Health Opinions. Unit B3 - Management of scientific committees II Opinion of the SCAN on the use of enzymatic product Natuphos® 5000 (3-phytase; EC

3.1.3.8) as feed additive. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out44_en.pdf> Acessado em: 20/06/2010.

HEY, M. J.; JACKSON, D. P.; YAN, H. The salting-out effect and phase separation in aqueous solution of electrolytes and poly (ethylene glycol). **Polymer**, v. 46, p. 2567-2572, 2005.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 64, p. 175–186, 2004.

HONG, K.; MA, Y.; LI, M. Solid-State fermentation of phytase from cassava dregs. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, p. 777-785, 2001.

HOSSEINKHANI, B. EMTIAZI, G NAHVI, I. Analysis of phytase producing bacteria (*Pseudomonas* sp.) from poultry faeces and optimization of this enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 4229-4232, 2009.

Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz:métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3.ed. São Paulo, 1985.

IN, M.; SEO, S.; KIM, D. C.; OH, N. Purification and biochemical properties of an extracellular acid phytase produced by the *Saccharomyces cerevisiae* CY strain. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 122–126, 2009.

IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochem.** v. 43, p. 1019–1032, 2008

JAYAKUMAR, G.; KANTH, S. V.; CHANDRASEKARAN, B.; RAGHAVA RAO, J.; NAIR, B. U. Preparation and antimicrobial activity of scleraldehyde from *Schizophyllum commune*. **Carbohydr Res**, v. 13, p. 2213-9, 2010.

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. **Industrial Crops and Products**, v. 11, p. 1–5, 2000.

JERMUTUS, L.; TESSIER, M.; PASAMONTES, L.; VAN LOON, A.P.; LEHMANN, M. Structure-based chimeric enzymes as an alternative to directed enzyme evolution: phytase as a test case **J. Biotechnol.**, v. 85, p. 15-24, 2001.

JOSEPH, I.; RAJ, R. P. Isolation and characterization of phytase producing *Bacillus* strains from mangrove ecosystem. **J. Mar. Biol. Ass. India**, v. 49, p. 177 - 182, 2007.

KALAČ, P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. **Food Chemistry**, v. 113p. 9-16, 2009.

KAUR, O; SATYANARAYANA, T. Production of cell-bound phytase by *Pichia anomala* in an economical cane molasses medium: Optimization using statistical tools. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3095-3102, 2005.

KIM, Y.O., KIM, H.K., BAE, K.S., YU, J.H., OH, T.K. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. **Enz. Microb. Technol.**, v. 22, p. 2–7, 1998.

KJELDAHL, J. A new method for the determination of nitrogen in organic matter
Z. **Anal. Chem.** v. 22, p.366, 1883.

KONIETZNY, U.; GREINER, R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). **Int. J. Food Sci. Technol.**, v. 37, p. 791–812, 2002.

KUMAR, V.; SINHA, A. K.; MAKKAR, H.P.S, BECKER, K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. **Food Chemistry** v. 120, p. 945–959, 2010.

LASSEN, S. F. BREINHOLT, J.; OSTERGAARD, P. R.; BRUGGER, R.; BISCHOFF, A.; WYSS, M.; FUGLSANG, C. C. Expression, Gene Cloning, and Characterization of Five Novel Phytases from Four Basidiomycete Fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4701-4707, 2001.

LI, X.; CHI, Z.; LIU, Z.; YAN, K.; LI, H. Phytase Production by a Marine Yeast *Kodamea ohmeri* BG3. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 149, p. 183-193, 2008.

LIEBERT, F.; PORTZ, L. Nutrient utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed plant based low phosphorus diets supplemented with graded levels of different sources of microbial phytase. **Aquaculture**, v. 248, p. 111–9, 2005.

LIEBERT, F.; PORTZ, L. Different sources of microbial phytase in plant based low phosphorus diets for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* may provide different effects on phytate degradation. **Aquaculture**, v. 267, p. 292-299, 2007.

LIMA, U.A.; AQUARONE E.; BORZANI W.; SCHMIDELL W. **INC: Fermentação em Estado Sólido. Biotecnologia Industrial.** São Paulo, SP: Edgard, 2001.

LIU, B. L., RAFIQ, A., TZENG, Y. M. AND ROB, A. The induction and characterization of phytase and beyond. **Enzyme Microb. Technol.** V.22, p. 415–424, 1998.

LIU, J. C.; OCKENDEN, I.; TRUAX, M.; LOTT, J. N. A. Phytic acid- phosphorus and other nutritionally important mineral nutrient elements in grains of wild-type and low phytic acid (*pta l*)- If Rice. **Seed Sci. Res.**, v. 14, p. 109-116, 2004.

LIU, Y. The Human Intensified Global Phosphorus Flows and Environmental Impacts . **International Institute for Applied Systems Analysis** , 2006.

LONGO, M. A.; COMBES, D. Thermostability of modified enzymes: a detailed study. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 74, p. 25–32, 1999.

LONSANE, B.K., GHILDYAL, N.P., BUDIATMAN, S., RAMAKRISHNA, S.V. Engineering aspects of solid state fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, p. 258 - 265, 1985.

MARSHAK, D. R.; KADONAGA, J. T.; BURGESS, R. R.; KNUTH, M. W.; BRENNAN, W. A.; LIN, S. **Strategies for protein purification and characterization – a laboratory course manual**. United States of America. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.

MCDOWELL, L. R. **Minerals in animal and human nutrition**. Ed. Elsevier, 2^a edição, 2003.

MICHIAKI, M.; KOJI, K.; KAZUO, K. Effects of polyols and organic solvents on thermostability of lipase. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 70, p. 188–92, 1997.

MITCHEL, D. B.; VOGEL, K.; WEIMANN, B. J.; PASAMONTES, L.; VAN LOON, A. P. G. M. The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. **Microbiology**, v. 143, p. 245-252, 1997.

MORADALI, M.F.; MOSTAFAVI, H.; GHODS, S.; HEDJAROUDE, G.A. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). **Int. Immunopharmacol.**, v. 7, p. 701–724, 2007.

MULLANEY, E. J.; GIBSON, D. M.; ULLAH, A. H. Positive identification of a lambda gt11 clone containing a region of fungal phytase gene by immunoprobe and sequence verification. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 35, p. 611-4, 1991.

MULLANEY, E. J.; DALY, C. B.; ULLAH, A.H. J . Advances in phytase research. **Adv Appl Microbiol.**, v. 47, p. 157-199, 2000.

NIGHAM, P. S.; PANDEY, A. Biotechnology for Agro-industrial Residues Utilization. In: Pre-treatment of Agro-industrial Residues. **Springer**, p. 25, 2009.

NOUREDDINI, H.; DANG, J. Degradation of phytase in Distillers' grains and gluten feed by *Aspergillus niger* phytase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, DOI 10.1007/s12010-008-8365-2, 2008.

OHM, R. A.; JONG, J. F.; LUGONES, L. G.; AERTS, A.; KOTHE, E.; STAJICH, J. E.; et al.: Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune*. **Nature Biotechnology**, v. 28, p. 957–963, 2010.

OMOGBENIGUN, F.O.; NYACHOTI, C. M.; SLOMINSKI, B. A. The effect of supplementing microbial phytase and organic acids to a corn-soybean diet to earlyweaned pigs. **J. Anim. Sci.**, v. 81, p. 1806–1813, 2003.

PAN, H-I.; YAO, H-J.; LI, Y-K. Effective extraction and purification of β -xylosidase from *Trichoderma koningii* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 196-201, 2001.

PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v.27, p109-17, 1992.

PANDEY, A. In Solid-State Fermentation. Ed., Wiley Eastern Limited, New Delhi, India, p. 3–10, 1994.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGAM, P. **Solid-state fermentation in biotechnology**. New Delhi: Asiatech Publishers Inc: Phytase production can be induced by various cereal grains, bran, seeds or seed meals, 2001.

PANDEY, A., SZAKACS, G., SOCCOL, C.R., RODRIGUEZ-LEON, J.A. & SOCCOL, V.T. Production purification and properties of microbial phytases. **Bioresource technology**. v.77, p.203 – 214, 2001a.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R. **Enzyme Technology**. 1ª edição, p.359-371, 2001b.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I—bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153–1169, 2000.

PANDEY, A., SELVAKUMAR, P., NIGAM, P., SOCCOL, C.R. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. **Curr. Sci.**77, 149–162, 1999.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81 - 84, 2003.

PANDEY, A.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C.R. **Current developments in solid-state fermentation**. Asiatch: New Delhi, p.253-264, 2007.

PAPAGIANNI, M.; NOKES, S.; FOLER, K. Production of phytase by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochem.**, v. 35, p. 397–402, 2000.

PAPAGIANNI, M.; NOKE, S. E.; FILE, K. Submerged and Solid-State Phytase Fermentation by *Aspergillus niger*. Effects of Agitation and Medium Viscosity on

Phytase Production, Fungal Morphology and Inoculum Performance. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 39, p. 319–326, 2001.

PARTON, C.; WILLIS, P. **Strain preservation, inoculum preparation and development**. In: Fermentation a Practical Approach, B. McNeil, L. M. Harvey (Eds.), Oxford University Press, Oxford, p. 123–155, 1990.

PASAMONTES, L.; HAIKER, M.; WYSS, M.; TESSIER, M.; VAN LOON, A. P. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. **Appl Environ Microbiol.**, v. 63, p. 1696-700, 1997.

PAYNE, R. L.; LAVERGNE, T.K.; SOUTHERN, L. L. A comparison of two sources of phytase in liquid and dry forms in broilers. **Poultry Science**, v. 84, p. 265-272, 2005.

PERIČIN, D. M.; MAĐAREV-POPOVIĆ, S. Z.; VAŠTAG, Z. G. Partitioning of acid protease from *Penicillium roqueforti* in aqueous two-phase system polyethylene glycol/phosphate. **APTEFF**, v. 39, p. 171-180, 2008.

PESSOA, JR.; KILILIAN, B.V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Barueri, SP: Manole, 2005.

PONTOPPIDAN, K.; PETTERSSON, D.; SANDBERG, A.-S. Interaction of phytate with protein and minerals in a soybean-maize meal blend depends on pH and calcium addition. **J. Sci. Food Agric.**, v. 87, p. 1886-1892, 2007.

PORTO, T. S. **Extração da ascorbato oxidase de Cucurbita maxima por processo descontínuo e contínuo em coluna de discos rotativos perfurados utilizando sistemas de duas fases aquosas**. Tese de Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo, 126 p., 2008.

PORTO, T.S.; MEDEIROS G.M.; PORTO, C.S.; CAVALCANTI, M.T.H.; NETO, B.B.; LIMA-FILHO, J.L. CONVERTI, A.; PORTO, A.L.F.; PESSOA JR. A. Liquid–liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 47, p. 716-721, 2008.

PRODANOVIĆ, J. M.; ANTOV, M. G. The influence of molecular weight of polyethylene glycol on separation and purification of pectinases from *Penicillium cyclopium* in aqueous two-phase system. **APTEFF**, v. 39, p. 1-212, 2008.

QUAN, C.; ZHANG, L.; WANG, Y.; OHTA, Y. Production of phytase in a low phosphate medium by a novel yeast *Candida krusei*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, p. 154-160, 2001.

QUAN, C.; TIAN, W.; FAN, S.; KIKUCHI, J. Purification and Properties of a Low-Molecular-Weight Phytase from *Cladosporium* sp. FP-1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 97, n. 4, p. 260–266, 2004.

RABELO, A. P. B.; TAMBOURGI, E. B.; PESSOA Jr., A. Bromelain partitioning in two-phase aqueous system containing PEO-PPO-PEO block copolymers. **J. Chromatogr. B**, 807 (2004), 61-68.

RAI, M. P. Enhanced Production of Laundry Detergent Compatible *Bacillus* Protease in Aqueous Two-Phase System. **International Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 6,p. 811–817, 2010.

RAIMBAULT, M., ROUSSOS, S. AND LONSANE, B. K. **Solid state fermentation at ORSTOM**: History, evolution and perspectives. In: Advances in solid substrate fermentation. Kluwer Acad. Pub. pp. 577-612, 1997.

RAMACHANDRAN, S.; ROOPESH, K.; NAMPOOTHIRI, M.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Mixed substrate fermentation for the production of phytase by *Rhizopus* spp. using oilcakes as substrates. **Process Biochemistry**, V. 40, P. 1749-1754, 2005.

ROBINSON, E. H.; LI, M. H.; MANNING, B. B. Comparison of microbial phytase and dicalcium phosphate for growth and bone mineralization of pond-raised channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **J Appl Aquacult**, v. 12, p. 81–8, 2002.

RODEHUTSCORD, M.; PFEFFER, E. Effects of supplemental microbial phytase on phosphorus digestibility and utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Water Sci Technol**, v. 31, p. 143–7, 1995.

ROSE, D. J. Foreword to the Fifth international conference on mushroom biology and mushroom products. **Acta Edulis Fungi**, 12 p.1-2, 2005.

ROSEN, G. **Microbial phytase in broiler nutrition**. In: Recent Advances in Animal Nutrition (Eds. Garnsworthy, P.C. and Wiseman, J.), Nottingham University Press, Nottingham, UK. p. 105-117, 2002.

ROOPESH, K.; RAMACHANDRAN, S.; NAMPOOTHIRI, K.M.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. **Bioresour. Technol.**, v. 97 p. 506–511, 2006.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. APhA Publications 5 ed, 2005.

SABU, A.; SARITA, S.; PANDEY, A.; BOGAR, B.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C.R. Solid-state fermentation for production of phytase by *Rhizopus oligosporus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 102-103, N.1-6, p251-260, 2002.

SAJIDAN, A.; FAROUK, A.; GREINER, R.; JUNGBLUT, P.; MÜLLER, E.-C.; BORRIS, R. Molecular and physiological characterisation of a 3-phytase from soil bacterium *Klebsiella* sp. ASR1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 110-118, 2004.

SAMBORSKA, K., GUIAVARCH, Y., VAN LOEY, A., HENDRICKX, M. The influence of moisture content on the thermostability of *Aspergillus oryzae* α -amylase. **Enzyme microb. technol.**, v. 37, p. 167-174, 2005.

SANTOS, J. A.; AMARAL, M. C. O.; ARAÚJO, T. A. S.; FERNANDES, K. G. C.; CHAVES, A. C.; MORAIS, M. M. C. Isolation of a lipase-producing *trichosporon* spp and enzyme extraction by two-phase aqueous system. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 62-64, 2007.

SCHAEFER A, KOPPE WM. Effect of a microbial phytase on utilization of native phosphorus by carp in a diet based on soybean meal. **Water Sci Technol**, v. 31, p. 149–55, 1995.

SCHWALB, M. N. Developmentally regulated proteases from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. **J Biol Chem.**, v. 10, p. 8435-9, 1977.

SEITZ, L. M.; SAUER, D. B.; BURROUGHS, R.; MOHR, H. E.; HUBBARD, J. D. Ergosterol as a measure of fungal growth. **Phytopathology**, v. 69, p. 1202-1203, 1979.

SHIMIZU, M. Purification and characterization of phytase and acid phosphatase produced by *Aspergillus oryzae* K1. **Biosci., Biotechnol., Biochem.**, v. 57, p.1354-1365, 1993.

SINGH B.; KUNZE G.; SATYANARAYANA, T. Developments in biochemical aspects and biotechnological applications of microbial phytases. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 6(3), p. 69–87, 2011.

SINGH, B., SATYANARAYANA, T. Phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in solid state fermentation and its potential applications, **Bioresour Technol**, v. 99, p. 2824–2830, 2008.

SINGH, B., SATYANARAYANA, T. Characterization of a HAP–phytase from a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile*. **Bioresource Technology**, v.10, p. 2046-2051, 2009.

SINGHANIA, R. R.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Application of tropical agro-industrial residues as substrate for solid state fermentation process. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Current developments in solid-state fermentation**. New Delhi: Springer, 2007. p. 412.

SMITH, D.R., MOORE, P.A.; MILES, D.M.; HAGGARD, B.E.; DANIEL, T.C.. Decreasing phosphorus runoff losses from landapplied poultry litter with dietary modifications and alum addition. **J. Environ. Qual.**, v. 33, p. 2210-2216, 2004.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205 - 218, 2003.

SONI, S. K.; MAGDUM, A.; KHIRE, J. M. Purification and characterization of two distinct acidic phytases with broad pH stability from *Aspergillus niger* NCIM 563. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 26, 2009-2018, 2010.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. Dissertação de Mestrado em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2005.

SPIER, M. R.; LETTI, L. A.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. A Simplified Model for *A. Niger* FS3 Growth during Phytase Formation in Solid State Fermentation. Braz. **Arch. Biol. Technol.** v.52, p.151-158, 2009.

SPIER, M.R.; FENDRICH, R.; ALMEIDA, P.; NOSEDA, M.; GREINER, R.; KONIETZNY, U.; WOICIECHOWSKI, A.; SOCCOL, V.; SOCCOL, C. R. Phytase produced on citric byproducts: purification and characterization. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 27, p. 267-274, 2010.

SPIER, M.R.; SCHEIDT, G.N; PORTELLA, A.C; RODRÍGUEZ-LEÓN, J.A.; WOICIECHOWSKI, A.L.; GREINER, R.; SOCCOL, C.R. Increase in Phytase Synthesis During Citric Pulp Fermentation. **Chemical Engineering Communications**, v. 198, p. 286 – 297, 2011.

SRI-AKKHARIN, W. **Production and characterization of extracellular phytase from *Pseudomonas* sp.** Degree of Master of Science Biotechnology, Faculty of Graduate Studies of Mahidol University, 2004.

STEFAN, H.; ANJA, K.; EDZARD, S.; JOERG, B.; MARKUS, L.; OSKAR, Z. Biotechnological production and applications of phytases. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 68, p. 588–97, 2005.

TADASHI, N.; SATOSHI, K.; TADANORI, Y.; HIDEHARU, A.; YOKO, K.; SEIJI, S.; KEIICHI, Y. **Phytase having a low michaelis constant for phytic acid from *Monascus***. United States Patent 6261592 (2001), disponível em: <www.freepatentsonline.com/6261592.html>. Acessado em 2010.

TAHIR, A.; MATEEN, B.; SAEED, S.; USLU, H. Studies on the production of commercially important phytase from *Aspergillus niger* st-6 isolated from decaying organic soil. **Micol. Apl. Int.**, v. 22, p. 51-57, 2010.

TENGERDY, R. P. Cellulase production by solid substrate fermentation. **J Sci Ind Res.**, v. 55, p. 313–316, 1996.

THYAGARAJAN, R.; Namasivayam, S. K. R. Influence of carbon source on phytase production by *Aspergillus niger*. **International Journal of Biological Technology**, v.1, p. 78-80, 2010.

TRINDADE, I. P. DIOGO, M. M.; PRAZERES, D. M. F.; MARCOS, G. C. Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography. **Journal Chromatography B**, v. 1082, p. 176-184, 2005.

TUBIO, G.; NERLI, B.; PICÓ, G. Relationship between the protein surface hydrophobicity and partitioning behavior in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-dextran. **Journal of Chromatography B**, v. 799, p. 293-301, 2004.

ULLAH, A. H. J.; SETHUMADHAVAN, K.; MULLANEY, E. J. Unfolding and Refolding of *Aspergillus niger* PhyB Phytase: Role of Disulfide Bridges. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 8179–8183, 2008.

United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service. USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 17, 2008. Disponível em: Nutrient Data Laboratory Home Page, <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>. Acessado em 2009.

VAN DIJCK, P.W. M. Chymosin and phytase, made by genetic engineering. **Biotechnol.**, v. 67, p. 77-80, 1999.

VAN STADEN, J.; DENHAAN, R.; VAN ZYL, W. H.; BOTHA, A.; VILJOEN-BLOOM, M. Phytase activity in *Cryptococcus laurentii* ABO 510. **FEMS Yeast Res.**, v. 7, p. 442-448, 2007.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; BRAVO, V.; FERNÁNDEZ-SERRANO, M.; NIKOLAEVA, I. Simultaneous phytase production and rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on dry olive wastes. **Industrial Crops and Products**, v. 26, p. 332-336, 2007.

VATS, P.; BANERJEE, U. C. Studies on the production of phytase by a newly isolated strain of *Aspergillus niger* var teigham obtained from rotten wood-logs. **Process Biochem.**, v. 38, p. 211–217, 2002.

VATS, P.; BANERJEE, U. C. Production studies and catalytic properties of phytases (myoinositolhexakisphosphate phosphohydrolases): An overview. **Enzym. Microbiol. Technol.**, v. 35, p. 3-14, 2004.

VATS, P.; BANERJEE, U. C. Biochemical characterisation of extracellular phytase (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase) from a hyper-producing strain of *Aspergillus niger* van Teighem. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v. 32, p. 141-147, 2005.

VIVEROS, A.; BRENES, A.; ARIJA, I.; CENTENO, C. Effects of Microbial Phytase Supplementation on Mineral Utilization and Serum Enzyme Activities in Broiler Chicks Fed Different Levels of Phosphorus. **Poultry Science**, v. 81, p. 1172–1183, 2002.

VOHRA, A.; SATYANARAYANA, T. Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. **Crit. Rev. Biotechnol.** 23 (2003) 29-60.

VRIES, O. M. H.; KOOISTRA, W. H. C. F.; WESSELS, J. G. H. Formation of an Extracellular Laccase by a *Schizophyllum commune* Dikaryon. **Journal of General Microbiology**, v. 132, p. 2817-2826, 1986.

WALDROUP, P. W. Nutritional approaches to reducing phosphorus excretion by poultry. **Poultry Science**, v. 78, p. 683-691, 1999.

WANG, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. **Int. J. Pharmaceutics**, v. 185, p. 129–188, 1999.

WOODZINSKI, R. J.; ULLAH, A. H. J. Biochemical characterization of cloned *Aspergillus fumigatus* phytase (phyA). **Adv. Appl. Microbiol.** v. 42, p. 263–302, 1996.

XU, Y.; SOUZA, M. A.; RIBEIRO-PONTES, M. Z.; VITOLO, M.; PESSOA Jr., A. Liquid-liquid extraction of pharmaceuticals by aqueous two-phase systems. **Braz. J. Pharm. Sci.** 37 (3) (2001), 305-320.

YAN, F.; KERSEY, J. H.; FRITTS C. A.; WALDROUP, P.W. Phosphorus requirements of broiler chicks six to nine weeks of age as influenced by phytase supplementation. **Poult. Sci.**, v. 82, p. 294-300, 2003.

YANG, W-J.; KIM, K-W. Kinetic Properties of Rat Intestinal. Phytase/Alkaline Phosphatase. **Korean Biochem, J.**, v. 27, p. 342-345, 1994.

YOON, S. J.; CHOI, Y. J.; MIN, H. K.; CHO, K. K.; KIM, J. K.; LEE, S. C.; JUNG, Y. H. Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 449-454, 1996.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; HAMZEHZADEH, S. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems of containing polyethylene glycol and sodium succinate or sodium formate. *Computer Coupling of Diagrams and Thermochemistry*, p. 1-6, 2005.

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous Two-Phase Partitioning**. New York: Marcel Dekker, 1995.

ZHEN, W. D. MS thesis, Positive nitrogen source for *A. niger* HZ-94 in phytase production on starch liquid medium. Njing Agricultural University, China, 1996.

ZHAO, Q.; LIU, H.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y. Engineering of protease-resistant phytase from *Penicillium* sp.: High thermal stability, low optimal temperature and pH. **Journal of Bioscience and Bioengineering** v. 110, p. 638-645, 2010. ZUO, R.; CHANG, J.; YIN, Q.; CHEN, L.; CHEN, Q.; YANG, X.; ZHENG, Q.; REN, G.; FENG, H. Phytase gene expression in *Lactobacillus* and analysis of its biochemical characteristics. **Microbiological Research**, v. 165, p. 329—335, 2010.